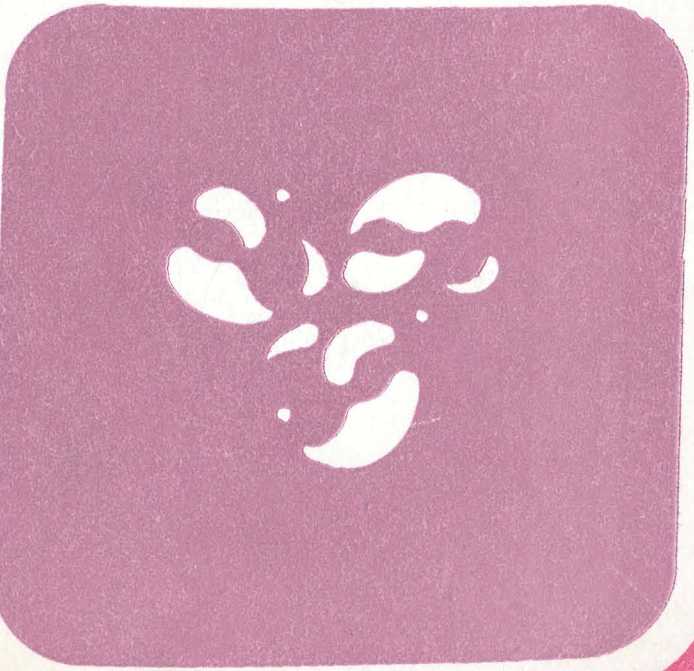
VISIT…

Ау607730

В.Е. МАТВЕЕВ

ОСНОВЫ АСЕПТИКИ В ТЕХНОЛОГИИ чистых микробиологических препаратов



ББК 36
М33
УДК 663.18

Матвеев В. Е. Основы асептики в технологии чистых микробиологических препаратов. — М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1981. — 312 с.

В книге рассмотрены вопросы промышленного получения чистых культур микроорганизмов, используемых в технологии пищевых и микробиологических производств при получении ферментов, витаминов, аминокислот, белково-витаминных концентратов, бактериальных заквасок и удобрений, а также микробиологических средств защиты сельскохозяйственных растений. Даны теоретические основы гарантированной защиты продуктов от посторонней микрофлоры. На конкретных примерах показаны пути практического использования рекомендуемых расчетных методов при дальнейшем совершенствовании режимов стерилизации оборудования и коммуникаций, при гарантированном получении стерильных жидкостей и сохранении их биологической полноценности, при получении стерильного воздуха в количествах, определяемых требованиями технологии, при дальнейшем повышении эффективности герметизации аппаратов и трубопроводов и защите внешней среды при работе микробиологических производств.

Предназначена для инженерно-технических и научных работников пищевой и микробиологической промышленности.

Таблиц 40. Иллюстраций 49. Список литературы — 165 названий.

Рецензенты: докт. биол. наук, проф. И. М. ГРАЧЕВА, докт. техн. наук, проф. В. Л. ЯРОВЕНКО.

М $\frac{31709—035}{044(01)—81}$ 35—81 (П. П.) 2910000000

© **Издательство «Легкая и пищевая** промышленность», 1981 г.

Предисловие

Микробиологическая промышленность является одной из самых молодых и наиболее быстро развивающихся отраслей народного хозяйства СССР. С получением и переработкой популяций микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности у нас в стране связаны не только микробиологическая, но и медицинская промышленность (антибиотики, витамины, кровезаменители), здравоохранение (вакцины и другие бактерийные и вирусные препараты медицинского назначения), а также пищевая промышленность (ферменты, дрожжи, лимонная кислота и др.), на базе которой зародились первые производства, целенаправленно использующие полезные свойства микроорганизмов.

Сфера целенаправленного использования микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности в различных областях науки и техники, в промышленности и сельском хозяйстве в последние годы значительно расширилась. Были созданы новые микробиологические производства, обеспечивающие получение кормовых добавок, средств защиты растений, незаменимых аминокислот, чистых иммобилизованных ферментов и т. д. Потребности практики выдвигают задачи развития новых научных дисциплин, в том числе микробиологической технологии, науки о целенаправленном получении популяций микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности с заданными свойствами, в оптимальных условиях. Использование результатов этой науки в различных отраслях промышленности позволит значительно повысить эффективность микробиологических производств.

Ценность продукции большинства микробиологических производств во многом определяется их стандартностью и качеством. На эти характеристики существенным образом влияет наличие в продуктах различных примесей, в том числе посторонней микрофлоры и продуктов ее жизнедеятельности, многие из которых обладают токсическими свойствами. Отсюда следует особая актуальность решения задач асептики применительно к производствам, получающим продукты жизнедеятельности целевых микроорганизмов для пищевых целей.

Отметим, что посторонние микроорганизмы, участвующие в технологическом процессе, наносят и прямой экономический ущерб, потребляя при своем развитии питательные вещества и уменьшая тем самым выход основного продукта. Посторонняя микрофлора отрицательно влияет и на качество некоторых технологических операций, следующих за ферментацией (фильтрация, ионный обмен, концентрирование, временное хранение полуфабрикатов), резко снижая эффективность производства.

Даже в условиях лабораторий получение чистых микробиологических препаратов представляет собой довольно сложную проблему. При переходе к промышленному производству эта проблема усугубляется появлением сложных технических систем, включающих аппараты, трубопроводы, арматуру и контрольно-измерительную аппаратуру, в которых необходимо создавать и поддерживать асептические условия. Такая задача ранее в отечественной литературе не рассматривалась. В имеющихся публикациях, как правило, затронуты лишь отдельные вопросы, например стерилизация питательных сред, воздуха и др. Однако успешное решение задачи гарантированного получения чистых микробных препаратов возможно только при комплексном рассмотрении всех процессов и технических систем, обеспечивающих достижение асептических условий.

Культура микробиологического производства предполагает не только защиту получаемых препаратов от посторонней микрофлоры (внутренняя задача), но и максимальное снижение концентрации целевых микроорганизмов в лабораторных и производственных помещениях (внешняя задача). Такие задачи взаимно дополняют друг друга и поэтому рассматриваются совместно, с единых позиций, на основе количественной характеристики процессов. В нашей стране это проведено впервые.

Создать предлагаемую читателю книгу было бы невозможно без помощи учеников и товарищей автора, в первую очередь Г. Е. Скворцова, А. В. Эйромджанца, Ю. Ф. Салтыкова. Автор искренне благодарит их за оказанную помощь, постоянную поддержку и активную работу по развитию обсуждаемых проблем.

1. ЗНАЧЕНИЕ АСЕПТИКИ В ТЕХНОЛОГИИ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ

1.1. Основные термины

Начиная данный раздел, отметим, что терминология в области биотехнологии еще не является устоявшейся и во многом несет на себе печать и традиции как первых бродильных производств, так и современных химических производств, использующих термины химической технологии. Это в полной мере справедливо и для научного направления, связанного с обоснованием и разработкой теории, режимов, методов и технических устройств, гарантирующих получение чистых микробиологических препаратов.

Терминологические разночтения начинаются уже с таких фундаментальных понятий, как «ферментация», «асептика», «стерильность» и др. Более того, имеется множество толкований и термина «чистые культуры микроорганизмов». Приведем лишь некоторые из них. Еще Кох ввел метод чистых культур, предполагавший, что инокулят гарантированно содержит только известные виды бактерий [142]. В другой работе [98] приведено несколько иное толкование: «Чистая культура может быть определена как культура, которая содержит только один тип микробов, полученный от одной и той же исходной клетки». По-другому звучит следующее определение: «Операции ферментации должны проводиться с чистой культурой продуцентов, т. е. быть «стерильными» (имеется в виду отсутствие посторонней микрофлоры)» [85]. Весьма своеобразно трактуются вопросы получения чистых культур: выращивание микроорганизмов — продуцентов антибиотиков в глубинных условиях поставило задачу «свести на нет возможность инфицирования основной культуры посторонней микрофлорой, т. е. ведение процесса биосинтеза в стерильных условиях» [9]. В то же время приводится весьма четкое определение: «Чистой называется культура микроорганизма одного вида, не загрязненная посторонней микрофлорой» [36].

Еще большие различия наблюдаются в толковании терминов «асептика» и «асептические условия». Применительно к технологии микробиологических производств эти термины начали использовать сравнительно недавно. Их смысл, присущий им в медицине, где они впервые нашли свое применение, существенно изменился. Например, отмечается, что асептика имеет более частное значение, чем стерильность, и применяется для характеристики условий, гаран-

тированно предполагающих отсутствие в рассматриваемой среде вредных микроорганизмов [98]. Аналогичный смысл придается термину при формулировке требований к выпускаемым стерильным химико-фармацевтическим препаратам [63]. В другой работе [144] термин «асептика» имеет более широкое значение, чем термин «стерильность»; отмечено, что именно в результате решения проблем асептики удалось получить большинство антибиотиков, ферментов, различные алкалоиды, полисахариды, гиббереллины, витамины и многие другие продукты микробиологических производств. По нашему мнению, наиболее точно смысл этих терминов выражается в следующем: «Для обеспечения чистоты культуры... все операции... производятся в асептических условиях, т. е. в условиях, препятствующих попаданию посторонней микрофлоры» [36, 131].

Приведенные примеры, несомненно, не исчерпывают всего многообразия определений, достаточно широко распространенных в литературе. Они лишь свидетельствуют о настоятельной необходимости в объединении усилий специалистов различного профиля при решении задач по созданию единой терминологии.

Отмеченные особенности вынуждают остановиться на основных используемых терминах.

В чистой культуре должны быть микроорганизмы только одного вида. Обсуждая вопросы обеспечения необходимых условий получения таких культур на различных этапах (от эталонного штамма в лаборатории до промышленных ферментаторов объемом около сотен кубических метров), а также особенности реализации комплекса необходимых и значительно отличающихся по своему содержанию процессов (стерилизация и герметизация оборудования и коммуникаций, введение добавок, посев, отбор проб, стерилизация пеногасителей, питательных сред, воздуха и др.), мы говорим о создании и поддержании асептических условий. Такие условия гарантированно (с заданной вероятностью) исключают возможность проникновения посторонней микрофлоры и продуктов ее жизнедеятельности не только в культуру целевых микроорганизмов, но и в стерильные полости аппаратов, коммуникаций, запорной и регулирующей арматуры и контрольно-измерительных приборов.

Под стерилизацией понимается полное освобождение любого из материальных потоков, а также оборудования и коммуникаций от жизнеспособных микроорганизмов. Следовательно, с позиций этого термина стерилизацией являются как очистка воздуха и жидкостей от микроорганизмов методом фильтрации, так и уничтожение микроорганизмов с помощью любого из при-

меняемых на практике летальных факторов (тепло, ионизирующая радиация и др.).

Термин «микроорганизмы-загрязнители» (посторонняя микрофлора) в известной нам литературе часто заменяется термином «контаминанты». Мы полагали, что в данном случае нет каких-либо оснований не следовать этой терминологии, хотя известно, что нередко контаминантами называют самые различные загрязнители, в том числе и в областях, весьма далеких от микробиологии и биотехнологии.

1.2. Микробиологическая характеристика окружающей среды

Микробиологическую характеристику окружающей среды обычно дают на основе подсчета количества микроорганизмов в единице объема воды, воздуха и др. Иллюстрацией обсемененности воды различных источников, которые могут являться основой водоснабжения микробиологических производств, служат данные [34] табл. 1.

Таблица 1. **Количество микроорганизмов в 1 мл воды, определяемое различными методами**

Водоисточники	Метод прямого счета (вся микрофлора)	Метод посевов (аэробные сапрофиты)
Артезианские скважины	До десятков тысяч	До 10
Водопровод	Тысячи или десятки тысяч	До 100
Водохранилища	От десятков тысяч до миллионов	От десятков до тысяч
Реки	То же	От сотен до десятков тысяч
Стоки	От сотен миллионов до триллионов	От миллионов до десятков миллиардов

Существующая оценка обсемененности водоемов может быть полезна при решении вопросов о возможности и целесообразности использования воды из данного источника для определенных технологических нужд, например для приготовления питательных сред, мытья аппаратов, их охлаждения и др. Например, между качеством воды и содержанием в ней сапрофитных микроорганизмов существует следующая зависимость:

Оценка качества воды	Число колоний, вырастающих при посеве на питательный агар 1 мл воды
Очень чистая	До 10
Чистая	Десятки
Умеренно загрязненная	Сотни
Загрязненная	Тысячи
Грязная	Десятки тысяч
Очень грязная	Сотни тысяч или миллионы

Отмечено [34], что на содержание сапрофитных микробов в поверхностных слоях водоемов влияют многие факторы. Например, известно, что общее число микроорганизмов в поверхностных слоях иловых отложений выражается сотнями миллионов на 1 г сырого ила. Во время сильного ветра (или вследствие других причин), при взмучивании ила бактерии попадают в толщу воды, значительно повышая ее обсемененность. Существенное влияние на скорость размножения и количество бактерий в воде оказывает температура.

При выборе методов деконтаминации воды часто важно знать состав сапрофитной микрофлоры водоемов. Так, в чистых водоемах до 80% всей аэробной сапрофитной микрофлоры приходится на долю кокковых форм, 20% составляют палочковидные формы [9]. В воде наиболее часто встречаются Micrococcus candicans, Bacterium aquatilis communis, Micrococcus roseus, Pseudomonas fluorescens, Sarcina lutea, Torula rosea и др. и значительно реже Serratia marcescens, Chromobacterium violaceum, Bacillus cereus, Bacillus mycoides.

Информацию, подобную приведенной выше, можно использовать на этапах проектирования и эксплуатации технических систем микробиологического производства, предназначенных для обработки и транспортировки воды, а также водных суспензий, растворов. В частности, показатель обсемененности необходим для количественной характеристики устройств, задерживающих или уничтожающих микрофлору. Необходимо и знание обсемененности воздуха, который во многих случаях является источником загрязнения не только помещений микробиологических предприятий, но и получаемых продуктов. Например, в 1 м^3 воздуха над Москвой в зависимости от высоты содержится следующее число клеток [29]: 500 м — 2000—3000; 1000 м — 1500; 2000 м — 500.

Эти данные отнюдь не однозначно характеризуют обсемененность воздуха в пределах даже одного города. Об этом свидетельствует и табл. 2 [29]. Таким об-

Таблица 2. **Содержание микробов в 1 м³ воздуха различных районов города**

Место взятия пробы воздуха	По данным Miquel	По данным К. И. Рудакова	По данным Я. Г. Кишко
Центр города	3475—10830	4305—9845	2726—5144
Парк в окрестностях города	148—464	175—345	543—1049

разом, концентрация микроорганизмов в воздухе является характеристикой, варьирующей в широком диапазоне. Отмечено, что состав микрофлоры неспецифичен и формируется за счет почвенных микроорганизмов [29]. Типичными представителями микрофлоры воздуха являются Bac. subtilis, Bac. megatherium, Bac. mycoides, Bac. mesentericus vulgatus, Micrococcus candicans, M. rosettaceus, M. roseus, M. subcarneus, M. chryseus, M. citreus conglomeratus, M. flavus, M. bipolaris, Bact. aureus, Bact. citreus, Sarcina alba, Sarcina rosea, Aspergillus, Actinomyces и др.

Приведенные данные характеризуют обсемененность воздуха в городе без учета функционирования микробиологических производств, которые, как показывает анализ литературы, существенно влияют на качество и количество микрофлоры воздуха в районах, непосредственно прилегающих к заводам. В этом отношении весьма показательны результаты обследования одного из ферментных заводов при поверхностном способе выращивания грибов Asp. oryzae и Asp. awamori [24]. В 1 м³ воздуха даже на расстоянии 500 м от предприятия содержалось до 1320 колоний. Очень высокой оказалась загрязненность воздуха рабочих помещений живыми микроорганизмами, концентрация которых непосредственно у рабочих мест достигала 40 000 клеток в 1 м³ [16]. Содержание дрожжевых клеток в удаляемом из ферментатора отработанном воздухе превышало 100 000 в 1 м³. В результате наблюдалась высокая обсемененность воздуха специфическими микроорганизмами на территории предприятия: на расстоянии до 250 м от дрожжевого цеха концентрация жизнеспособных дрожжей составляла до 500 клеток в 1 м³.

В литературе уже обсуждались вопросы специфической обсемененности воздуха, предпринимались попытки оценить ее влияние не только на технологию производства, но и на окружающую среду [93]. Отмечено, что повышенная загрязненность воздуха отрицательно сказывается на эффективности его стерилизации даже в наиболее современных технических системах. Рассмотрим это влияние на примере конкретных производств.

1.3. Влияние посторонней микрофлоры на эффективность микробиологических производств

В литературе неоднократно высказывалось мнение о том, что одним из важных резервов увеличения выхода кормовых дрожжей на спиртовых заводах является повышение культуры всего микробиологического производства и биологической чистоты основных цехов [22, 25, 93]. Имеющиеся экспериментальные данные свидетельствуют не только о значительном варьировании обсемененности различных полупродуктов, но и о своеобразном понимании термина «стерильность». Например, отмечается [25], что первичная барда после бражки при перегонке спирта «практически стерильна» при содержании в 1 мл 9—160 клеток в основном споровых форм микроорганизмов. Показано, что среда для выращивания дрожжей содержит большое количество как общей микрофлоры (высевается на мясопептонный агар — МПА), так и кислотообразующих микроорганизмов (рассев исследуемых проб на сусло-агар с мелом — САМ).

Накопленный опыт свидетельствует о том, что доминирующее развитие получают некоторые флюоресцирующие формы рода Pseudomonas и молочнокислые бактерии. Некоторые данные по обсемененности [25] представлены в табл. 3. Они свидетельствуют о том, что степень обсемененности барды незначительна лишь на начальных этапах обработки и возрастает с увеличением продолжительности работы оборудования (сборники барды, дрожжегенератор, дрожжерастильный чан).

При обсуждении вопросов, связанных с предупреждением гибели дрожжей при выращивании их на меласс-

Таблица 3. **Бактериальная обсемененность первичной барды (в тыс. клеток на 1 мл)**

Место отбора пробы	Сутки работы после профилактической остановки	Общая микрофлора на МПА	Кислотообразующие бактерии на САМ
Барда, попадающая из аппарата в сборник	1-е	0,060	0
	8-е	0,150	0
	9-е	0,009	0,005
	14-е	0,160	0
Барда у теплообменника до охлаждения	1-е	0,005	0,085
	8-е	0,050	0
	9-е	0	0,150
	14-е	0	0
Барда у теплообменника после охлаждения	1-е	22,4	32,8
	8-е	33,5	0
	9-е	23,0	0
	14-е	69,0	1,6
Барда, поступающая в сборники барды	1-е	2	1,6
	8-е	200	2650
	9-е	1000	182
	14-е	1250	2500
Барда, поступающая в дрожжегенератор и дрожжерастильный чан	1-е	23,6	7,1
	8-е	5000	7200
	9-е	1360	5400
	14-е	5250	8200
	23-е	15000	8500

сной барде, отмечается, что наибольшую опасность представляют нитритообразующие бактерии Bac. subtilis, Bac. mesentericus, Bac. megatherium и др., концентрация которых в мелассе может изменяться в диапазоне 200—2000 клеток на 1 г [22]. В качестве одной из важнейших мер повышения эффективности производства рекомендуется строго соблюдать требования технологического регламента по борьбе с посторонней микрофлорой.

Показано, что и при эксплуатации ацетонобутиловых заводов попадание посторонней микрофлоры в

процессе брожения приводит к нарушению технологического процесса. Например, при изучении некоторых конструкций и оценке их соответствия требованиям обеспечения стерильности в ацетонобутиловом производстве оказалось, что иногда при стыковке отдельных элементов применялись сварные швы «внахлестку». Образовавшиеся за счет этого объемы внутренних полостей составляли 60—19 000 см^3, а под фланцами трубопроводов — 5—14,8 см^3 [91]. Экспериментально показано, что в таких полостях могут находиться жизнеспособные микроорганизмы-контаминанты не только до стерилизации оборудования, но и после ее проведения. Подчеркивается, что в практической реализации метода непрерывного брожения одной из наиболее сложных задач является обеспечение в течение длительного времени стерильности процесса [93].

Исключительное значение придается обеспечению требований асептики в технологии производства антибиотиков [9, 36]. Попадание контаминантов в культуральную жидкость приводит к их росту и размножению, результатом чего являются изменение характеристик среды, нарушение оптимальных условий биосинтеза, снижение накопления антибиотика. При этом затрудняется фильтрация культуральной жидкости,, а получаемый фильтрат не соответствует предъявляемым требованиям. Известно, что многие посторонние микроорганизмы при развитии могут выделять фермент пенициллиназу, который инактивирует пенициллин. Следовательно, применительно к заводам, производящим антибиотики, решение проблем асептики непосредственно влияет на эффективность производства, стандартность и качество получаемых препаратов.

Отмечено [120, 140], что в последние годы значительно повысилась роль вакцин, используемых для предотвращения инфекционных заболеваний как среди людей, так и среди животных. Эффективность действия этих вакцин зависит главным образом от содержания в них определенных специфических антигенов, которые, будучи введены в организм, способствуют выработке и сохранению антител. Антигены должны обладать высокой специфичностью и чистотой, поскольку для живого организма небезразлично введение какого-либо чужеродного вещества. Поэтому необходимо, чтобы антигены были, насколько это возможно, свободными от всех посторонних веществ, которые могли бы влиять на их собственную специфическую активность.

Серьезное внимание вопросам борьбы с посторонней микрофлорой уделяется при получении животных клеток, например ВНК-21 [11], при производстве ферментных препаратов [27] и лимонной кислоты [137].

Итак, не вызывает сомнения тот факт, что попадание посторонней микрофлоры в питательную среду и

особенно в культуральную жидкость является нежелательным по нескольким соображениям. Во-первых, нарушается нормальный режим роста и развития целевых микроорганизмов. Во-вторых, непроизводительно расходуется питательная среда, так как незначительное время генерации почти всех представителей посторонней микрофлоры, быстрая адаптация к окружающей среде приводят, как правило, к преимущественному развитию контаминантов. Наконец, в культуральной жидкости накапливаются продукты метаболизма посторонней микрофлоры, влияние которых на рост и развитие целевых микроорганизмов, их последующую переработку и хранение не поддается количественному прогнозированию.

Получены интересные результаты по изучению скорости размножения различных видов облигатно-термофильных аэробных бактерий (Bac. stearothermophilus, Bac. circulans, Bac. megatherium, Bac. brevis) [37]. Для сравнения взяты близкие к термофильным в видовом отношении мезофильные бактерии (Bac. subtilis, Bac. mesentericus). Показано, что скорость роста у облигатно-термофильных бактерий чрезвычайно высокая. В среднем увеличение их количества в среде продолжается 5—8 ч; продолжительность экспоненциальной фазы 1—1,5 ч; время генерации: при 55° С 28—21 мин, при 70° С 13—14 мин. Максимальная концентрация в среде $3 \cdot 10^9$ клеток в 1 мл. Дополнительные сведения приведены в табл. 4.

Таблица 4. **Время генерации (в мин) некоторых микроорганизмов при различной температуре**

Микроорганизм	30° С	35° С	40° С
Bac. subtilis	52	40	26
Bac. megatherium	35	32	22

Таким образом, целевые микроорганизмы при прочих равных условиях не могут конкурировать с посторонней микрофлорой, попавшей в питательную среду.

В табл. 5 приведено расчетное время достижения различных уровней загрязнения культуральной жидко-

Таблица 5. **Время достижения (в ч) ожидаемого уровня бактериального загрязнения на 1 мл культуральной жидкости (расчетные данные) при различном объеме**

Время генерации, ч	Уровень загрязнения							
	$1 \cdot 10^5$ клеток				10^7 клеток			
	1 л	1 м³	10 м³	100 м³	1 л	1 м³	10 м³	100 м³
0,3	15	18	19	20	17	20	21	22
0,5	20	25	27	29	24	29	30	32
1,0	33	44	47	50	40	50	54	57
2,0	60	80	87	94	74	94	100	107

сти для условий получения некоторых типовых продуктов микробиологических производств при продолжительности лаг-фазы, равной 7 ч. Эти результаты в известной мере условны, поскольку в расчете предполагается экспоненциальный рост контаминантов. Однако с их помощью можно реально представить опасность попадания даже одной бактериальной клетки в культуральную жидкость. В некоторых случаях даже в аппарате вместимостью 100 м³ высокий уровень загрязнения — $1 \cdot 10^7$ клеток в 1 мл — может быть достигнут уже через 22 ч. Отметим, что при реализации таких весьма чувствительных к посторонней микрофлоре процессов, как получение витамина B_{12} и глютаминовой кислоты, продолжительность процесса ферментации составляет 100 и 50 ч соответственно [123].

Необходимо подчеркнуть, что, помимо прямого экономического ущерба, наличие посторонней микрофлоры и продуктов ее жизнедеятельности в выпускаемых препаратах снижает их стандартность, меняет свойства, а в некоторых случаях может привести к дискредитации действительно полезных и необходимых народному хозяйству продуктов микробиологического синтеза. Именно поэтому выявление и устранение причин контаминации должны стать необходимым этапом в становлении и развитии почти всех микробиологических производств. Первый шаг в этом направлении — выявление и характеристика всех возможных путей поступления микрофлоры в аппараты и коммуникации.

2. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОЦЕССОВ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ ПОЛУЧЕНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ В ЛАБОРАТОРИЯХ И НА ПРОИЗВОДСТВЕ

Анализ микробиологических производств показывает, что самой показательной в отношении обеспечения требований асептики является, несомненно, стадия культивирования (ферментации), где наиболее полно представлены процессы, реализация которых на практике может приводить к загрязнению культур целевых микроорганизмов посторонней микрофлорой. Для удобства изложения материала мы условно выделили три группы таких процессов.

Процессы обработки материалов и материальных потоков. В лабораторных условиях, как правило, не наблюдаются материальные потоки, характерные для полупромышленного и промышленного производства. Обрабатываются лишь материалы (питательные среды, буферные растворы, пеногасители), обычно находящиеся в небольших по объему емкостях (пробирки, колбы, бутыли), которые вместе с содержимым преимущественно однократно подвергаются воздействию теплового поля или химических деконтаминантов. Воздух, поступающий через ватно-марлевые пробки в расположенные на качалках емкости, не проходит предварительной обработки и не требует применения каких-либо дополнительных технических устройств.

Однако в пилотных, полупромышленных и промышленных установках жидкости и воздух передаются по системам трубопроводов, большинство из которых поддерживается в стерильном состоянии. В этом случае речь следует вести о материальных потоках, подвергающихся периодической или непрерывной обработке и передаваемых от мест получения к аппаратам-потребителям (в данном случае к ферментаторам).

Как пример можно привести поток питательной среды, поступающей из специализированного цеха через установку непрерывной стерилизации в ферментаторы. Аналогичный путь, как правило, проходят пеногасители, водные растворы сахаров, буферные растворы, которые должны подвергаться специальной обработке для предупреждения возможной контаминации содержимого ферментатора. Другим примером является поток технологического воздуха, который на пути от воздухозаборных устройств до ферментаторов

проходит обработку в различных аппаратах, а после заключительной очистки от посторонней микрофлоры подается в культуральную жидкость.

Какие же общие черты присущи материальным потокам? Во-первых, все они являются носителями посторонней микрофлоры, т. е. представляют собой потенциальные источники загрязнения. Во-вторых, несмотря на различные физические и химические свойства, они представляют собой объекты, из которых следует удалить (путем задержки или уничтожения) постороннюю микрофлору. В-третьих, такие материальные потоки в наибольшей степени характерны для пилотных установок и особенно для микробиологических производств, в то время как в условиях лабораторий мы сталкиваемся преимущественно с обработкой отдельных материалов (стерилизация среды в колбах, введение вручную добавок и др.). В-четвертых, в условиях современного промышленного микробиологического производства для подготовки, транспортировки и обработки материальных потоков используют достаточно сложные специализированные технические системы, включающие аппараты, коммуникации, запорную и регулирующую арматуру, а также контрольно-измерительные приборы. В-пятых, общим для всех потоков является постоянное изменение специфических характеристик (например, обсемененности) по мере прохождения технических систем. Наконец, для таких систем необходимо разработать единый методический подход к достижению и поддержанию в них асептических условий, а также обеспечению нужной эффективности обработки с учетом требований, экспериментально обоснованных при разработке регламента.

Процессы отбора проб и введения добавок. К сожалению, при современном уровне развития методов и способов контроля за качеством ведения процессов ферментации на многих производствах еще необходим периодический отбор проб культуральной жидкости, анализируемых затем в лаборатории. С позиций обеспечения требований асептики процесс отбора проб, неизбежно связанный с операциями подключения к ферментаторам и отключения от них, представляет собой потенциальный источник загрязнения, который должен быть всесторонне проанализирован (подробно этот

вопрос будет рассмотрен в разделе 8). Специфическими в плане требований асептики являются и процессы дозирования различных стерильных жидкостей, а также чистых культур микроорганизмов (см. раздел 9).

Процессы, реализуемые при подготовке и эксплуатации оборудования. При подготовке оборудования и коммуникаций для создания в них асептических условий осуществляются два важных процесса: стерилизация внутренних полостей и герметизация всех элементов и узлов. Если стерилизация характерна только для подготовительного этапа (в ходе ферментации в этом плане осуществляются лишь профилактические мероприятия, например создание и поддержание термических затворов), то процесс достижения и особенно сохранения необходимой степени герметизации должен осуществляться и при эксплуатации оборудования (вопросы термической стерилизации оборудования и коммуникаций с помощью насыщенного водяного пара рассмотрены в разделе 4, вопросы герметизации — в разделе 7).

Отметим некоторые наиболее принципиальные особенности задачи по достижению и поддержанию асептических условий в аппаратах современных микробиологических производств. Первая из них заключается в исключительном многообразии возможных путей поступления посторонней микрофлоры в аппараты и коммуникации (с воздухом, водой, посевным материалом, добавками и др., из-за недостаточной стерилизации оборудования или его неэффективной герметизации). Вторая особенность состоит в разнохарактерности потоков — потенциальных носителей посторонней микрофлоры. Следующая особенность — это независимость конечного результата (загрязнения посторонней микрофлорой) от вида материального потока, в котором находятся контаминанты. Важной особенностью является и то, что в условиях промышленного производства процессы, которые в итоге могут привести к контаминации оборудования и продуктов, реализуются, как правило, в сложных инженерных системах, включающих различные аппараты, коммуникации, запорную и регулирующую арматуру, контрольно-измерительные приборы. Суммарная эффективность задержки и (или) инактивации контаминантов зависит, таким образом,

от качества работы как систем в целом, так и входящих в них элементов, а также от характеристик материальных потоков (количество и состав посторонней микрофлоры, соотношение между отдельными клетками и их конгломератами, наличие примесей, скорость потоков, адгезионные свойства и др.).

3. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПРОЦЕССОВ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ ДОСТИЖЕНИЕ И ПОДДЕРЖАНИЕ АСЕПТИЧЕСКИХ УСЛОВИЙ

Итак, процессы, использование которых на практике способствует достижению и поддержанию асептических условий, весьма многообразны и разнохарактерны по своему внутреннему содержанию. Условно в них можно выделить две группы: процессы, основанные на уничтожении посторонней микрофлоры, и процессы, предполагающие ее удаление из материального потока. Таким образом, в первую группу можно отнести все процессы, основанные на использовании самых различных летальных факторов, в том числе тепла, давления, ионизирующей радиации, химических веществ и др., а во вторую — процессы фильтрующей стерилизации и герметизации.

Следует подчеркнуть, что до настоящего времени не разработано единой общепризнанной теории достижения и поддержания асептических условий. Большинство исследователей, как правило, ограничиваются изучением частных процессов, не предпринимая попыток обобщить и проанализировать накопленные экспериментальные данные. Такое положение можно объяснить, по нашему мнению, не только отсутствием необходимого объема количественной и качественной информации, но и исключительной сложностью поведения биологических систем, не позволяющей в настоящее время выявить истинные механизмы инактивации микроорганизмов под действием различных факторов. Сочетания микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности с техническими системами, предназначенными для их обработки или удаления, представляют собой сложные и своеобразные биолого-инженерные комплексы, теоретические основы которых еще не разработаны и требуют решения с участием специалистов самых различных профессий: микробиологов, математиков, технологов, механиков и др.

Чувствительность микроорганизмов к средствам, применяемым для их уничтожения, варьирует в широком диапазоне и зависит от многих причин [148]. В их числе вид микроорганизмов, содержание в них воды и ее состояние, значение pH, возраст клеток или спор, условия их культивирования и др. Поэтому разработка

теории в настоящее время идет преимущественно по пути создания математических моделей. Что касается процессов задержки контаминантов в различных технических устройствах, то применительно, например, к фильтрам тонкой очистки воздуха разработаны основные положения теории, которые уже в течение многих лет используются в практике работы микробиологических производств.

3.1. Термическая стерилизация

Процессы термической стерилизации наиболее широко используются в микробиологических производствах для достижения стерильности оборудования и коммуникаций, различных жидкостей, а в некоторых случаях и воздуха. Воздействие повышенной температуры приводит к гибели микроорганизмов при определенных условиях, зависящих как от вида контаминантов, так и от их концентрации, состояния (сухие, влажные, отдельные клетки или их конгломераты), наличия защитных веществ, пленок и др. Среди известных нам публикаций наиболее обстоятельно принципиальные вопросы взаимодействия клеток (в том числе и микроорганизмов) с температурой рассмотрены в работе [1]. В частности, отмечена исключительная способность термофильных микроорганизмов (именно они являются основным объектом в интересующем нас процессе) жить и размножаться при температуре, не только убивающей другие организмы, но и денатурирующей большинство белков в растворах. Повышенная теплоустойчивость термофилов обусловлена более высокой скоростью синтетических процессов, чем скорость распада клеточных компонентов. Получены экспериментальные данные о связи гибели микроорганизмов с повреждением в них РНК и ДНК [1, 99, 134].

Однако расшифровка истинного механизма гибели микроорганизмов под действием повышенной температуры далека от завершения, а биологический смысл так называемых кривых отмирания (графическая зависимость между временем действия летального фактора и относительным числом выживших клеток) до сих пор еще недостаточно ясен [40, 42, 134]. Весьма незначительна информация и по кинетике отмирания микроорганизмов. Поэтому исследователи для решения научно-прикладных задач по количественной оценке эффективности режимов термической стерилизации и

19
Дзяржаўная
бібліятэка
БССР
імя У. І. Леніна

прогнозирования ее результатов идут по пути создания математических моделей, учитывающих основные особенности процессов инактивации.

Математические модели процессов термической инактивации микроорганизмов. Прежде всего остановимся на количественных характеристиках эффективности термической стерилизации, которые наиболее часто употребляются в литературе (табл. 6).

Таблица 6. **Наиболее употребляемые характеристики эффективности термической стерилизации**

Характеристика	Физический смысл	Условное обозначение
Смертельное время	Время, необходимое для инактивации всех микроорганизмов данной популяции	τ_c
Время гибели 90% популяции	Время, необходимое для снижения концентрации микроорганизмов в 10 раз	τ_{10}
Зависимость отмирания микроорганизмов от температуры	Разность температур, необходимая для изменения τ_{10} в 10 раз	Z
Удельная скорость гибели	Количество микроорганизмов, отмирающих в единицу времени	k
Фактор инактивации	Логарифм отношения начального числа спор (N_0) к конечному числу спор (N), выживших после нагревания	n
Критерий стерилизации	Натуральный логарифм отношения количества жизнеспособных спор N_0 до стерилизации к количеству N жизнеспособных спор в момент времени τ после начала стерилизации	∇

Значения некоторых характеристик приведены в табл. 7—11.

Таблица 7. **Значения τ_{10} (в с) для суспензий спор некоторых аэробных бактерий [148]**

Бактерия	Температура, °С					
	100	120	130	140	150	160
Bac. cereus	12,1	4,2	2,6	1,3	1,0	0,7
Bac. subtilis	27,8	4,5	3,1	2,1	1,1	0,5
Bac. stearothermophilus	2857,0	38,6	8,8	3,9	2,4	1,4

Таблица 8. **Значения параметра τ_{10} для некоторых бактериальных спор, экспонированных к влажному теплу**

Микроорганизм и штамм	Суспендирующая среда	Температура, °С	τ_{10}, мин
Bac. cereus			
NCTC 5893	Фосфатный буфер (pH 7,0)	100	5,5
То же	То же	121,1	0,0065
Bac. licheniformis			
NCTC 7589	Не указана	100	13,5
Bac. pantothenticus			
NCTC 8162	»	100	7,3
Bac. megatherium			
ATCC 8245	Вода	100	0,83
NCTC 7581	»	100	1,0
То же	»	115	0,025
»	Фосфатный буфер (pH 7,0)	121,1	0,04
Bac. coagulans			
Sp. 33	Не указана	106	6,3—7,3
То же	»	108	4,2—4,6
»	»	110	2,2—2,5
»	»	112	1,2—1,8
»	Фосфатный буфер (pH 7,0)	121,1	3,0
Bac. coagulans var. thermoacidurans			
ATCC 8038	То же	89	32,05
То же	»	93	18,8
»	»	96	8,31
»	»	86	71,14
Bac. stearothermophilus			
NCIB 8919	Вода	115	25
То же	»	115	24
»	Дрожжи	115	34
NCIB 8157	Вода	121	4
То же	»	115	11
NCA 1518	Не указана	115,6	7,03
То же	Снятое молоко	127	0,13
NCIB 8224	Фосфатный буфер (pH 7,0)	121,1	14,0
Bac. subtilis			
NCTC 8236	Вода	100	11,3
То же	То же	105	2—2,5
Bacillus			
I-11	Фосфатный буфер (pH 6,8)	107,5	14
То же	То же	110	6,9
»	»	112,5	4,3
»	»	115	2,2

Продолжение табл. 8

Микроорганизм и штамм	Суспендирующая среда	Температура, °С	τ_{10}, мин
То же	То же	117,5	1,3
»	»	121	0,57
Bacillus			
I-12	»	107,5	16,6
То же	»	110	9,1
»	»	112,5	4,9
»	»	115	2,75
»	»	117,5	1,55
»	»	121	0,71
5230 (15U)	Фосфатный буфер (pH 7,0)	121,1	0,48
То же	То же	121,1	0,08
»	»	121	0,35
Cl. perfringens			
ATCC 3624	Не указана	100	0,31—0,39
IU-1168	То же	100	1,0—1,5
T-65	»	100	5,2—6,6
NCTC-8238	»	100	13,0—17,6
Cl. sporogenes			
PA 3679	Фосфатный буфер (pH 7,0)	107	13,4—16,1
То же	То же	111	5,84—8,04
»	»	115	2,77—3,63
»	»	90	1000
»	»	121	0,84
NCTC 532	Вода	70	1170
То же	То же	80	245,8
»	»	90	34,2
Cl. botulinum			
E	Не указана	77	1,8
62 A	Буфер	112,8	1,23
12885 A	То же	112,8	1,09
213 B	»	112,8	1,32
32 B	»	112,8	0,15
Cl. butyricum			
555	Фосфатный буфер (pH 6,5)	85	23
То же	То же (pH 7,0)	85	23
»	Молоко	85	14
Cl. butyricum			
556	Фосфатный буфер (pH 6,5)	85	18
То же	То же (pH 7,0)	85	12
»	Молоко	85	21

Продолжение табл. 8

Микроорганизм и штамм	Суспендирующая среда	Температура, °С	τ_{10}, мин
Cl. tyrobutyricum			
500	Фосфатный буфер (pH 6,5)	90	6,5
То же	То же (pH 7,0)	90	13
»	» (pH 7,5)	90	13
»	Молоко	90	9
»	Фосфатный буфер (pH 7,0)	121	0,012
»	Молоко	121	0,006
514	Фосфатный буфер (pH 6,5)	90	15
То же	То же (pH 7,0)	90	20,9
»	» (pH 7,5)	90	18
»	Молоко	90	14,1
»	Фосфатный буфер (pH 7,0)	121	0,012
»	Молоко	121	0,008
518	Фосфатный буфер (pH 6,5)	90	11
То же	То же (pH 7,0)	90	18
»	» (pH 7,5)	90	21
»	Молоко	90	10
»	Фосфатный буфер (pH 7,0)	121	0,003
»	Молоко	121	0,007
Cl. aureofoetidum			
NCTC 505	Вода	80	4205
То же	То же	90	139,1
»	»	95	27,2
Cl. histolyticum			
NCIB 503	»	70	1097
То же	»	80	243,1
»	»	85	40,5
»	»	90	11,5

Более полные сведения о значении τ_{10} по набору микроорганизмов даны в работе [80], однако представленный температурный диапазон не охватывает всех значений, характерных для режимов термической стерилизации в современных микробиологических производствах. Тем не менее эти данные позволяют заклю-

чить, что с повышением температуры значения τ_{10} уменьшаются; наиболее резистентными к теплу являются споры микроорганизма Bac. stearothermophilus.

Терморезистентность различных типов микроорганизма (например, Cl. botulinum) варьирует в достаточно широком диапазоне. Наконец, на значения τ_{10} существенно влияет суспендирующая среда, в которой находятся микробные клетки.

Даже приведенные весьма неполные данные о показателях термической устойчивости микроорганизмов указывают на достаточно большой объем информации, полученной в этой области. Заметим, что значения τ_{10}

Таблица 9. **Значения Z для спор микроорганизмов, экспонированных к влажному теплу [80]**

Микроорганизм	Температура, °С	Микроорганизм	Температура, °С
Bac. stearothermophilus	7	Cl. tetani	9,0
Термофилы	10	Cl. botulinum B-364	6,2
Bac. subtilis	13	Cl. botulinum	12
То же	8,2	в фосфатном буфере	
»	9,4	Cl. tyrobutiricum	8,4—10
Bac. cereus	7,4	Cl. perfringens	10
Bac. licheniformis	6,0	Cl. aureofoetidum	6,8
Bac. megatherium	8,8	Cl. histolyticum	10
Bac. pantothenticus	10,6	Cl. sporogenes	13
		Cl. sporogenes PA 3679	10,6

Таблица 10. **Значение удельной скорости гибели спор Bac. stearothermophilus штамм 1518 при различных температурах [42, 145]**

Температура, °С	κ, мин$^{-1}$	Температура, °С	κ, мин$^{-1}$	Температура, °С	κ, мин$^{-1}$	Температура, °С	κ, мин$^{-1}$
100	0,013	111	0,193	122	2,44	133	23,4
101	0,017	112	0,234	123	3,07	134	29,5
102	0,023	113	0,302	124	3,76	135	37,2
103	0,030	114	0,412	125	4,57	136	46,8
104	0,036	115	0,540	126	5,90	137	59,0
105	0,048	116	0,653	127	7,40	138	74,2
106	0,062	117	0,810	128	9,35	139	93,5
107	0,083	118	1,002	129	11,70	140	104,8
108	0,109	119	1,210	130	14,80	141	118,0
109	0,135	120	1,480	131	16,60	142	148,0
110	0,163	121	1,830	132	18,60	143	186,0

Таблица 11. **Значения критерия стерилизации для спор Bac. stearothermophilus штамм 1518 при различной температуре [42, 145]**

Температура, °С	∇	Температура, °С	∇	Температура, °С	∇	Температура, °С	∇
100	0,013	111	0,91	122	11,8	133	130,9
101	0,030	112	1,15	123	14,9	134	160,4
102	0,053	113	1,41	124	18,3	135	197,6
103	0,083	114	1,86	125	23,2	136	244,4
104	0,120	115	2,40	126	29,1	137	298,4
105	0,170	116	3,05	127	36,5	138	377,6
106	0,230	117	3,86	128	45,8	139	471,1
107	0,310	118	4,86	129	57,5	140	576,0
108	0,420	119	6,07	130	72,3	141	694,0
109	0,560	120	7,55	131	88,9	142	842,0
110	0,720	121	9,36	132	107,5	143	1028·0

получены в основном при температурах, характерных для режимов стерилизации различных продуктов в пищевой промышленности. Они не охватывают температурного диапазона, используемого в микробиологической промышленности при стерилизации оборудования и различных жидкостей. Однако, исходя уже из этих данных, можно заметить, что даже микроорганизмы одного вида существенно отличаются по термоустойчивости в зависимости от штамма и характеристик среды экспонирования.

Одним из основных в математических моделях, основанных на понятии смертельного времени, является соотношение [97]

$$\lg \tau/\tau_c = (t_c - t)/Z, \qquad (1)$$

где τ_c — время отмирания всех микроорганизмов в популяции при температуре t_c; τ — то же, но при температуре t; Z — см. табл. 6.

Очевидно, что

$$\tau = \tau_c \cdot 10^{\frac{t_c - t}{Z}}. \qquad (2)$$

Расчет эффективности режимов стерилизации основан на следующих предпосылках [72, 84]. Убыль количества жизнеспособных бактериальных спор во времени при повышенной температуре подчиняется логарифмической зависимости. Величина τ_{10} не зависит от кон-

центрации спор. Наибольшее количество выживших во время стерилизации спор соответствует наименее прогреваемой точке. Конечный эффект процесса стерилизации зависит от концентрации наиболее термоустойчивых бактериальных спор.

Иногда в практических расчетах используют следующее соотношение:

$$F_c = \tau \frac{1}{10^{\frac{121,1-t}{z}}} = \tau k_F, \qquad (3)$$

где F_c — приведенный стерилизующий эффект (время термической гибели); t — температура в наименее прогреваемой точке; τ — продолжительность поддержания температуры t; k_F — переводной коэффициент, называемый иногда коэффициентом летальности.

Часто в расчетах, особенно в технологии пищевых производств, пользуются экспериментально определенными характеристиками термической устойчивости спор Cl. botulinum, для которых $Z = 10°$ С. Значения коэффициента летальности для некоторых спор при температурах, характерных для режимов стерилизации, приведены в табл. 12.

Таблица 12. **Значения коэффициента летальности k_F для спор [32]**

Споры	Температура, °С						
	100	105	110	115	120	125	130
Cl. botulinum (Z=10° С)	0,0078	0,0246	0,0775	0,2460	0,7750	2,460	7,750
Bac. stearothermophilus (Z=12 °С)	0,0173	0,0457	0,1175	0,3162	0,8128	2,113	5,512

Стерилизующий эффект определяют как сумму значений k_F при температуре, достигаемой в наименее прогреваемой точке в периоды нагревания, выдержки и охлаждения стерилизуемого продукта во время замеров, которые повторяют через равные промежутки времени ($\tau_и$). Затем полученное значение Σk_F умножают на $\tau_и$ и получают фактическое значение стерилизующего эффекта [84, 97]. Такие расчеты полу-

чили широкое распространение в пищевой промышленности, особенно при стерилизации консервов.

Во многих расчетах, особенно в микробиологической и медицинской промышленности, пользуются моделями, в которых исходным является уравнение

$$dN/d\tau = -kN, \tag{4}$$

где k — удельная скорость гибели микроорганизмов; N — количество жизнеспособных микроорганизмов в момент времени τ.

Интегрирование уравнения (4) в пределах от 0 до τ и от N_0 до N приводит к решению:

$$\nabla = \ln N_0/N = \int_0^{\tau} k d\tau,$$

а при $$k = \text{const}\ (t = \text{const})\ N = N_0 \exp(-k\tau), \tag{5}$$

где N_0 — *количество жизнеспособных спор в популяции до стерилизации* ($\tau=0$).

Исходя из приведенного выше определения τ_{10},

$$N/N_0 = 1/10 = \exp(-k\tau_{10}), \tag{6}$$

откуда

$$\tau_{10} = 2{,}303/k \tag{7}$$

В некоторых случаях [31—33] термоустойчивость микроорганизмов выражают соотношением

$$F_C = n\tau_{10}, \tag{8}$$

$$n = \lg N_0/N \quad \text{(см. табл. 6)}. \tag{9}$$

Следовательно, фактор инактивации n ($\nabla = 2{,}3n$) *характеризует долю инактивированных при стерилизации микроорганизмов.* Например, при $n=8$ после стерилизации останется $1 \cdot 10^{-8}$ часть от исходного числа *жизнеспособных микроорганизмов данной популяции.*

В пищевой промышленности требуемое значение n определяют из выражения

$$n = \lg \frac{x_0 V \cdot 100}{b}, \tag{10}$$

где x_0 — концентрация спор в продукте, например в питательной среде, до стерилизации; V — объем среды; b — допускаемый брак по нестерильности (в процентах).

Все приведенные соотношения для расчета эффективности режимов стерилизации предполагают, что процесс отмирания микроорганизмов во времени под влиянием повышенной температуры описывается экспоненциальной зависимостью. Однако накопленные экспери-

ментальные данные свидетельствуют о том, что кривые отмирания часто имеют S-образный вид [42, 72, 134, 161]. Биологический смысл таких кривых еще не выяснен [134], однако при рассмотрении различных задач, в том числе и при построении математических моделей процесса инактивации, нужно учитывать отклонение от экспоненты, требующее ужесточения режима стерилизации.

В каких же условиях получают в основном экспоненциальную зависимость между количеством оставшихся жизнеспособных микроорганизмов и продолжительностью воздействия повышенной температуры? Как правило, это лабораторные данные, полученные в опытах на разбавленных гомогенных суспензиях микроорганизмов. Более того, в лабораториях часто экстраполируют полученные результаты, не доводя опыт до полного отмирания микроорганизмов данной популяции, а ограничиваясь лишь существенным снижением количества жизнеспособных спор. В то же время именно наличие весьма термостойких спор на практике часто приводит к нестерильным операциям, а отработанные в лабораториях режимы нуждаются в существенной корректировке в сторону увеличения температуры и (или) продолжительности ее воздействия. Это положение подтверждается уже полученными результатами [72]. На их основе предлагается оценивать стерилизующий эффект по уточненной формуле

$$F_{\text{с}} = \tau_{10}(n + x_n), \qquad (11)$$

где x_n — поправка, учитывающая отклонение кривой гибели от экспоненты.

Условия, при которых учитывается выживаемость наиболее термостойких спор, следующие:

$$N_{\text{т}} = mc \geqslant P^{-1} \quad \text{и} \quad N_{\text{т}} \geqslant N_{\max}/N_{\tau}, \qquad (12)$$

где $N_{\text{т}}$ — общее число спор в каждой серии образцов на одно соотношение температуры и времени; m — число образцов (например, капилляров); c — число спор в одном образце (капилляре).

В случаях, не отвечающих требованиям неравенств, величина $F_{\text{с}}$ не будет учитывать выживаемость наиболее термостойких спор [72]. Таким образом, при отработке режимов стерилизации вопрос о представительности исследуемых выборок является исключительно важным.

В пищевой промышленности иногда для расчета смертельного времени пользуются следующим соотношением [35]:

$$\ln \tau_c = \alpha - \beta t, \qquad (13)$$

где α и β — величины, характеризующие термическую устойчивость микроорганизмов и определяемые экспериментально.

В литературе еще довольно часто встречаются расчеты, основанные на характеристике Q_{10}:

$$Q_{10} = k_{t+10}/k_t = \tau_t/\tau_{t+10}, \qquad (14)$$

где k_t и τ_t — удельная скорость гибели спор и время гибели при температуре t соответственно; k_{t+10} и τ_{t+10} — то же при температуре t_{+10}.

Величина Q_{10} связана с величиной Z следующим соотношением [64]:

$$Z = 10/\lg Q_{10}. \qquad (15)$$

Принципиальный недостаток «метода Q_{10}» заключается в том, что величина Q_{10} не является константой, а зависит от температуры:

$$\ln Q_{10} = 10E/(RT^2 + 10RT), \qquad (16)$$

где E — энергия активации; R — газовая постоянная; T — температура стерилизации, $T = t + 273$.

Необходимо показать связь величины Z с величинами Q_{10} и F_c:

$$Z = (t_2 - t_1)/\left(\lg \tau'_{10} - \lg \tau''_{10}\right) = (t_2 - t_1)/(\lg F_1 - \lg F_2), \qquad (17)$$

где t_2 и t_1 — конечная и начальная температуры материала; τ_{10} — время десятикратного уменьшения популяции; $\tau'_{10} = 10\,\tau''_{10}$; F_c — время термической гибели; $F_1 = 10\,F_2$.

Большое число опубликованных в литературе моделей процессов инактивации базируется на знании удельной скорости гибели спор и энергии их активации. При этом учитывается экспериментально установленный факт, свидетельствующий о том, что изменение удельной скорости гибели спор в зависимости от температуры описывается известным уравнением Аррениуса [106, 107, 123].

$$k = A \exp(-E/RT), \qquad (18)$$

где A — стерический фактор (коэффициент).

Для двух отличающихся значений температуры:

$$\lg \frac{k_2}{k_1} = \frac{E}{2{,}303R}\left(\frac{T_2 - T_1}{T_1 T_2}\right). \qquad (19)$$

В этом виде уравнение Аррениуса можно использовать непосредственно для того, чтобы рассчитать энергию активации реакции гибели клеток.

Следует подчеркнуть, что уравнение Аррениуса является эмпирическим. Более точная зависимость скорости реакции гибели от термодинамических параметров определяется уравнением Эйринга, лежащим в основе теории абсолютных скоростей химических реакций:

$$k = \frac{k_b T}{h_п} \exp(-\Delta F^*/RT), \tag{20}$$

$$\Delta F^* = \Delta H^* - T\Delta S^*. \tag{21}$$

В приведенных уравнениях:
k_b — константа Больцмана; $h_п$ — постоянная Планка; ΔF^* — изменение свободной энергии активации; ΔS^* — изменение энтропии активации реакции; ΔH^* — затраты энергии активации.

Подставляя уравнение (21) в (20), получаем:

$$k = \frac{k_b T}{h_п} \exp\left(\frac{\Delta S^*}{R}\right)\left(-\frac{\Delta H^*}{RT}\right). \tag{22}$$

Сравнение уравнения (22) с уравнением (18) показывает, что член A непосредственно связан с энтропией активации реакции:

$$A = \frac{k_b T}{h_п} \exp(\Delta S^*/R), \tag{23}$$

а член ΔH^* — с энергией активации E ($\Delta H^* = E - RT \simeq E$).

Попытки использовать теорию скоростей химических реакций применительно к процессам инактивации микробных популяций предпринимались неоднократно [106, 107, 127]. При этом полагают, что в клетке происходит тепловая инактивация какой-то одной молекулы. Именно такой подход позволяет рассматривать процесс тепловой гибели как реакцию 1-го порядка. Для этого имеются следующие основания. Прямая активация молекул под воздействием тепловой энергии приводит к разрушению молекулярных связей, а по теории химических реакций подобный процесс протекает как реакция 1-го порядка. В условиях избытка кислорода при тепловой стерилизации реакцию окисления в микробных клетках можно рассматривать как реакцию 1-го порядка. Реакция с водой или парами воды в микробной клетке при значительном избытке

одного компонента (в данном случае воды) протекает не как реакция 2-го порядка, а подобно реакции окисления, как реакция 1-го порядка. В подобном случае в уравнении скорости снижения концентрации непрореагировавших молекул $C_м$ можно вместо $C_м$ подставить N (количество сохранившихся жизнеспособных микробных клеток), о чем уже сказано выше.

Хорошо известен подход к изучению гибели популяции в тепловом поле, основанный на теории мишеней [127]. По этой теории предполагается существование фактора гибели в виде частиц, подобных радиоактивным. В процессе стерилизации эти частицы сталкиваются с мишенями в структуре чувствительных к ним молекул ДНК, РНК или белка, вызывают глубокие изменения или разрушения, которыми и обусловливается гибель микробных клеток. Таким фактором гибели могут быть, например, молекулы воды в микробных клетках, возбужденные тепловой энергией.

Если p — вероятность того, что в результате столкновений частиц фактора гибели с мишенями в какой-то промежуток времени τ в каждой из мишеней произойдут изменения, в результате которых будут утрачены нормальные функции, то, взяв вместо числа клеток число мишеней, получим:

$$M' = M_0' \exp(-p\tau), \qquad (24)$$

где M_0' — число мишеней в момент времени $\tau=0$, т. е. до начала стерилизации; M' — то же, но в момент времени $\tau>0$.

Если принять, что в каждой клетке существует только одна мишень, т. е. $M'=N$ и $M_0'=N_0$, то

$$N = N_0 \exp(-p\tau). \qquad (25)$$

В этом случае $p=k$ рассматривают как временну́ю плотность вероятности возникновения условий гибели.

Соответствующие модели гибели клеток можно получить и на основе наиболее вероятного распределения клеток по теплоустойчивости [127].

Допустим, что теплоустойчивость клеток, измеряемая в данном случае продолжительностью их выживания при определенной температуре, варьирует от τ_1 до τ_i. Следовательно, по теплоустойчивости все клетки популяции можно разделить на i-групп и количество клеток, относящихся к каждой группе, обозначить как

$N_1, N_2, \ldots, N_i$. Если p_i — вероятность того, что какое-то количество клеток обладает теплоустойчивостью во времени τ_i, то вероятность P_τ $(N_1, N_2, \ldots, N_i)$ распределения клеток по теплоустойчивости можно представить как

$$P_\tau(N_1, N_2, \ldots, N_i) = \frac{N_0!}{N_1!N_2! \ldots N_i!} p_1^{N_1} p_2^{N_2} \ldots p_i^{N_i}. \quad (26)$$

Определение сочетания $N_1, N_2, \ldots, N_i$ при максимальном значении P_τ $(N_1, N_2, \ldots, N_i)$ дает:

$$N_i = C_1 \exp(-\beta_1 \tau_i), \quad (27)$$

где C_1 и β_1 — коэффициенты.

Для микробной популяции, состоящей из бесконечно большого количества клеток, уравнение (27) принимает вид

$$-\frac{dN}{d\tau} = C_1 \exp(-\beta_1 \tau), \quad (28)$$

а после интегрирования и замены коэффициентов —

$$N = N_0 \exp(-k\tau).$$

Таким образом, применение самых различных подходов, основанных на различных представлениях о механизме гибели клеток под действием теплового поля, позволяет получать экспоненциальную зависимость между количеством жизнеспособных клеток и продолжительностью их нагревания. Этот факт и многочисленные экспериментальные данные послужили основанием считать, что гибель клеток в тепловом поле подчиняется логарифмическому закону [35, 85, 123, 145, 148]. Однако не менее многочисленные данные указывают на существенное отклонение кривых гибели от экспоненты, особенно если речь идет о значительных объемах популяций микроорганизмов в производственных условиях. Существует множество объяснений S-образного характера кривых отмирания, предполагающих наличие периодов задержки (фаза термоактивации) и отмирания наиболее термостойких спор [42, 72, 99, 134]. Остановимся лишь на наиболее существенных из них, а также на соответствующих моделях.

Известно, что для микробных популяций характерно явление гетерархии, т. е. гетерогенности по многим признакам (продолжительность жизни, прочность обо-

лочек, размеры клеток и др.), например гетерогенность по признаку терморезистентности, которая в наибольшей степени проявляется у культур, полученных при периодическом культивировании. Таким образом, в условиях промышленного производства при выборе конкретных условий термической инактивации той или иной микробной популяции мы встречаемся с необходимостью уничтожения спор, значительно отличающихся по своей устойчивости к тепловому воздействию. Из результатов, полученных некоторыми авторами [72], следует, что продолжительность отмирания наиболее термостойких спор в несколько раз больше, чем основной массы спор, отмирающих по экспоненте. Наибольшая разница наблюдается при температуре, характерной для работы установок непрерывной стерилизации ($t > 130°$ С), что выдвигает повышенные требования к выбору режимов, предусматривающих сочетание температуры и времени ее воздействия на жидкость.

К причинам, приводящим к отмиранию популяций по S-образной кривой, относится и наличие не единичных клеток, а их конгломератов. На этот факт редко обращают внимание в условиях лабораторий, однако в промышленном производстве практически не встречаются популяции, состоящие из единичных микроорганизмов. Учет конгломератов совершенно необходим при обосновании режимов стерилизации.

Конгломераты клеток в реальных популяциях, как правило, покрыты пленками поверхностно-активных веществ (ПАВ), непосредственно влияющих на достижение требуемой температуры во всех точках стерилизуемого объема. На устойчивость микроорганизмов к действию тепла влияет не только их вид, но и возраст, а также условия культивирования, в отдельных случаях — и условия временного хранения и транспортировки.

В последние годы появились сообщения о том, что погибающие клетки выделяют в окружающую среду специфические защитные вещества [134].

По-видимому, отмеченные причины, приводящие к отклонению от экспоненциального закона отмирания популяций, не являются исчерпывающими. Однако они свидетельствуют о разном характере и многообразии факторов, в той или иной мере влияющих на выживае-

мость микробных популяций и вызывающих значительные трудности при создании математических моделей.

Так называемая полимолекулярная модель позволяет анализировать два возможных типа изменений в процессе гибели. Предполагают, что гибель клеток происходит в результате разрушения какого-то одного вида молекул в этих клетках. Причем, если в клетке содержится m' подобных молекул, то клетка погибает при разрушении n' из этих m' молекул. Если p — вероятность того, что в какое-то время τ будет разрушено какое-то число из m' молекул, а q — вероятность того, что они останутся неразрушенными, процесс можно описать следующим уравнением:

$$1 = (p+q)^{m'} = p^{m'} + m'p^{(m'-1)}q + \frac{m'(m'-1)}{2}p^{(m'-2)}q^2 + \\ + \ldots + \ldots \frac{m'!}{(m'-n')!\,n'!}p^{n'}q^{(m'-n')} + \ldots + q^{m'}. \quad (29)$$

Скорость гибели зависит от величин m' и n' и значения константы скорости реакции разрушения молекул. Вероятность разрушения молекул:

$$p = 1 - q = 1 - \exp(-k\tau), \quad (30)$$

а вероятность того, что молекулы не будут разрушены

$$q = \exp(-k\tau). \quad (31)$$

В соответствии с этими уравнениями для системы (m', n'), в которой гибель клетки обусловлена разрушением n' из m' имеющихся молекул, можно записать:

$$N/N_0 = \sum_{i=0}^{n'-1} m'C_i\,[\exp(-k\tau)]^{m'-i}\,[1-\exp(-k\tau)]^i, \quad (32)$$

где $m'C_i$ — коэффициент.

Из уравнения (32) выведено несколько уравнений для частных случаев:

$$N/N_0 = [1-\exp(-k\tau)]^{m'}, \quad (33)$$

$$N/N_0 = \exp(-m'k\tau), \quad (34)$$

$$N/N_0 = \exp(-k\tau). \quad (35)$$

Применение полимолекулярной модели существенно усложняется, когда гибель микроорганизмов связана с разрушением более чем одного типа молекул [127].

Достаточно известной является так называемая модель активированных спор [123]. Ее автор, анализируя

кривую гибели микроорганизмов, полученную при исследовании процесса тепловой гибели спор, связывает характер кривой с явлением замедленной гибели в начале нагревания. В самом деле, если k_1 — константа скорости перехода спор (N) в состояние прорастающих спор (N^*), а k_2 — константа скорости гибели спор, то

$$N = f\,[\exp(-k_1\tau);\quad \exp(-k_2\tau)]. \tag{36}$$

При более детальном исследовании этой модели полагают [151], что начальная популяция спор является смесью активированных (способных к образованию колоний на подходящей среде) и неактивированных спор N_0, которые при нагревании переходят (причем обратимо) в активированное состояние (A_0). Активированные споры под действием тепла погибают (удельная скорость гибели k), а неактивированные переходят в активное состояние (константа скорости тепловой активации α) и только после этого погибают (удельная скорость гибели k). Наглядно это представлено на схеме 1.

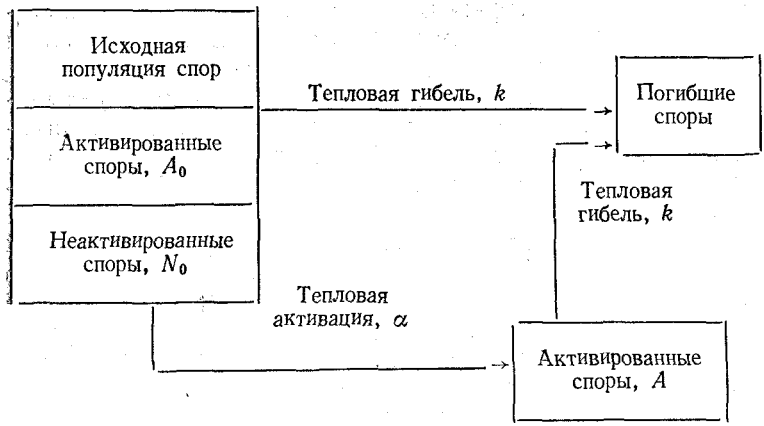


Схема 1. Упрощенная модель инактивации с учетом активированных бактериальных спор.

В момент времени τ количество жизнеспособных спор L_τ равно:

$$L_\tau = N_\tau + A_\tau, \tag{37}$$

где A_τ — количество активированных спор во время τ; N_τ — ко-

личество неактивированных спор в момент времени τ, изменяющееся в соответствии с уравнением

$$N_\tau = N_0 \exp(-\alpha\tau). \tag{38}$$

Изменение A_τ и L_τ во времени можно представить как

$$\frac{dA_\tau}{d\tau} = -kA_\tau + \alpha N_0 \exp(-\alpha\tau), \tag{39}$$

$$\frac{dL_\tau}{d\tau} = -kA_\tau. \tag{40}$$

При $\alpha \neq k$

$$A_\tau = A_0 \exp(-k\tau) + \frac{\alpha N_0}{k-\alpha}[\exp(-\alpha\tau) - \exp(-k\tau)]. \tag{41}$$

При $\alpha = k$

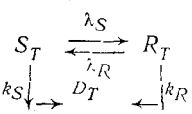
$$L_{\tau_2} - L_{\tau_1} = -k\int_{\tau_1}^{\tau_2} A_\tau d\tau. \tag{42}$$

При сравнении результатов опытов с Bac. stearothermophilus и расчетных данных форма кривых оказалась сходной, однако наблюдались и некоторые различия [151]. Для устранения последних авторы попытались отказаться от допущения, что тепловая активация протекает по типу реакции 1-го порядка.

Известны модели, учитывающие влияние предыдущего нагревания (история нагревания) в ходе стерилизации на тепловую чувствительность клеток. Стерилизуемую систему можно разделить на две следующие системы [127]:

— без предыстории нагревания — предшествующий нагрев в процессе стерилизации не влияет на тепловую чувствительность жизнеспособных клеток;

— с предысторией нагревания — предшествующий нагрев в процессе стерилизации влияет на тепловую чувствительность жизнеспособных клеток. Схема процесса представляется следующей:



Отмечено, что наиболее простой моделью системы с предысторией нагревания является модель, соответствующая реакции 1-го порядка. Теплочувствительность

молекул при нагревании изменяется от более низкой (R_T) к более высокой (S_T) или наоборот, но так или иначе молекулы оказываются с измененной тепловой чувствительностью (D_T). На приведенной выше схеме k — константа скорости изменений в направлении D_T, λ — константа скорости изменений в направлении S или R.

Данная модель позволяет описать процесс следующим образом:

$$N/N_0 = k_S \exp[-(k_S + \lambda_S)\tau] + (1 - k_S)\exp(-k_R\tau), \quad (43)$$

$$N/N_0 = k_R \exp[-(k_R + \lambda_R)\tau] + (1 - k_R)\exp(-k_S\tau), \quad (44)$$

$$k_S = \gamma_S^{(k_S - k_R)/(k_S + \lambda_S - k_R)}, \quad (45)$$

$$k_R = -\gamma_R^{(k_S - k_R)/(k_R + \lambda_R - k_S)}, \quad (46)$$

$$\gamma_S = 1 - \gamma_R = N_S/N_0 = 1 - \frac{N_R}{N_0}, \quad (47)$$

где N_S, N_R — исходное количество спор соответственно S и R; γ_S, γ_R — исходное относительное содержание спор соответственно S и R.

Такую модель использовали для анализа тепловой гибели спор Bac. subtilis var. niger и Bac. pumilus. Заслуживает внимания тот факт, что предположительная величина энергии активации соответствует реакции на этапе λ. Для спор Bac. pumilus этап λ_S представляет собой реакцию защитного (в отношении нагревания) типа ($S \rightarrow R$), при этом энергия активации составляет около 105 кДж/моль. Для спор Bac. subtilis var. niger этап λ_R, наоборот, является реакцией тепловой активации ($R \rightarrow S$), при этом энергия активации составляет 264,6 кДж/моль. Данная величина соответствует энергии активации тепловой денатурации белков (в отличие от энергии активации этапа λ у Bac. pumilus).

В приведенном выше рассуждении γ_S и γ_R принимались равными единице, однако подобный анализ возможен и при меньших значениях этих показателей, т. е. в случае, когда в исходной популяции спор одновременно присутствуют S- и R-споры. Некоторые авторы исходят из допущения, что в процессе термической

стерилизации среди активированных спор содержатся споры, уже инактивированные теплом [127, 151].

Если индекс i указывает на активированные споры, то общее количество жизнеспособных спор во время τ определяется как общая сумма N_i:

$$N = \sum_{i=1}^{w} N_i = N_0 \exp(-k\tau). \qquad (48)$$

На схеме 2 показана выведенная из этой общей мо-

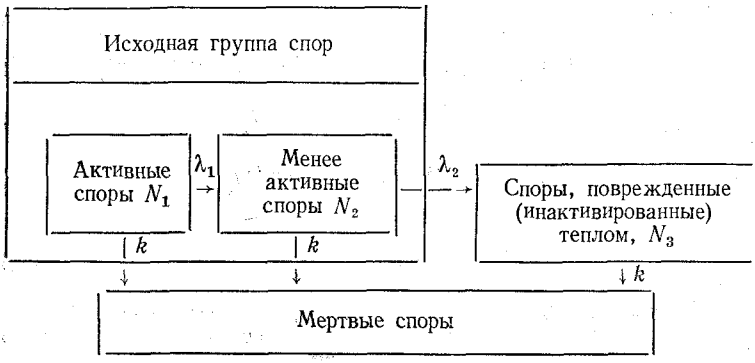


Схема 2. Упрощенная модель интерпретации процесса тепловой гибели спор Bac. subtilis.

дели упрощенная модель, которая оказалась пригодной для интерпретации процесса тепловой гибели спор Bac. subtilis. В этой упрощенной модели N_1 и N_2 — исходные группы спор, находящихся соответственно в активном и менее активном состоянии. Это согласуется с предположением о том, что в целом гибель жизнеспособных спор Bac. subtilis ($N = N_1 + N_2 + N_3$) описывается логарифмической зависимостью, а неповрежденных (неинактивированных) спор ($N^* = N_1 + N_2$) — S-образной кривой. Величины N и N^* во время τ определяются по следующим уравнениям:

$$N = N_1 + N_2 + N_3 = N_0 \exp(-k\tau), \qquad (49$$

$$N^* = N_1 + N_2 = \frac{\lambda_2}{\lambda_2 - \lambda_1} N_{10} \exp[-(\lambda_1 + k)\tau] + \\ + N_{20} - \frac{\lambda_1}{\lambda_2 - \lambda_1} N_{10} \exp[-(\lambda_2 + k)\tau], \qquad (50)$$

где $N_0 = N_{10} + N_{20}$; $N_{30} = 0$.

В некоторых работах рассмотрены выводы рациональных, по мнению авторов, моделей, основанных на знании кинетики химических реакций и служащих для определения условий выживания микробов при термическом воздействии [44, 100, 149, 150].

Учитывая сложность процессов, протекающих в стерилизуемой жидкости, большинство исследователей принимают некоторые допущения, упрощающие задачу создания моделей. Часто постулируют, что причиной гибели клеток являются необратимые химические реакции, среди которых особое место занимают реакции денатурации некоторых белковых компонентов. При этом признают, что распределение точек, в которых протекают реакции денатурации, носит статистический характер [44, 113]. Затем рассматривают идеализированный вариант: летальные условия однородны во всех частях стерилизуемой жидкости, а размножение клеток в созданных условиях подавляется мгновенно и полностью. Допускают, что популяция клеток гомогенна, а статистические особенности, имеющие отношение к гибели клеток, одинаковы во всех точках стерилизуемого объема жидкости. Весьма рационально предположение о том, что гибель каждой отдельной клетки является независимым событием. Следовательно, на вероятность гибели данной клетки в определенный момент времени не влияют те процессы, которые происходят в других клетках в данный момент или уже произошли до рассматриваемого момента времени.

Учитывая изложенные выше допущения, для описания процесса термической инактивации микроорганизмов можно использовать закон Пуассона [44]. Этот закон в теории вероятностей является предельным случаем биномиального распределения случайной величины и обеспечивает высокую точность, при которой число испытаний бывает относительно велико, а вероятность появления ожидаемого события в одном испытании весьма мала.

Применительно к процессу отмирания микробной популяции под действием повышенной температуры вероятность P_d возникновения d реакций денатурации в некотором объеме V (при среднем числе n центров реакций в единице объема) может выражаться формулой

$$P_d = \frac{(nV)^d}{d!} \exp(-nV), \tag{51}$$

где d — целое число ($d=1, 2, 3...$).

Если для инактивации клеток необходимо, чтобы в объеме возникло не менее d реакций, то все клетки, в которых возникнет реакций меньше ($d-1$, $d-2$, $d-3, ...$), останутся неповрежденными. Очевидно, что при $d=1$ неповрежденными или выжившими останутся только те клетки, в которых не возникнет ни одной реакции денатурации. Вероятность наличия таких клеток равна:

$$P_0 = \frac{(nV)^0}{0!} \exp(-nV) = \exp(-nV). \tag{52}$$

При $d=2$ останутся неповрежденными клетки, в которых возникло не более одной реакции денатурации, а вероятность наличия таких клеток равна:

$$P_0 + P_1 = \exp(-nV) + nV \exp(-nV) = \exp(-nV)(1 + nV). \tag{53}$$

Аналогичные рассуждения можно повторить для $d=3, 4, 5...$ Клетки, которые поражаются при $d=1$, условно называют одноударными, при $d=2$ — двухударными и т. д. При «многоударном» порядке отмирания популяции микроорганизмов ($d=m$) суммарная вероятность наличия неповрежденных клеток равна:

$$P_0 + P_1 + P_2 + \ldots + P_{m-1} = \left[1 + nV + \frac{(nV)^2}{2!} + \right.$$

$$\left. + \ldots + \frac{(nV)^{m-1}}{(m-1)!}\right] \exp(-nV). \tag{54}$$

Число погибших клеток равно произведению вероятностей на общее число объектов (N_0) в объеме жидкости, подвергаемой тепловой обработке. Очевидно, что число выживших клеток равно произведению N_0 на P_{d-1}:

$$N = N_0 \exp(-nV)\left[1 + nV + \frac{(nV)^2}{2!} + \ldots + \frac{(nV)^{m-1}}{(m-1)!}\right] \tag{55}$$

или

$$N = N_0 \exp(-nV) \sum_{d=0}^{m-1} \frac{(nV)^d}{d!}. \tag{56}$$

Первый член в уравнении (55) определяет число выживших одноударных клеток, у которых в объеме V не произошли реакции денатурации:

$$N = N_0 \exp(-nV), \tag{57}$$

т. е. описывает кинетику отмирания микроорганизмов по экспоненте. Однако уравнение (57) не отражает зависимости количества выживших клеток от времени, поэтому его нельзя использовать в практических расчетах. Для выяснения этой связи целесообразно записать уравнение (57) в следующем виде [44]:

$$\ln N_0/N = nV. \tag{58}$$

Величина, стоящая в левой части уравнения (58), представляет собой безразмерный критерий стерилизации ∇, характеризующий убыль количества жизнеспособных микроорганизмов во времени τ в зависимости от температуры и констант термической устойчивости микроорганизмов:

— для переменной температуры стерилизации

$$nV = A\int_0^{\tau} \exp(-E/RT)\, d\tau = \nabla, \tag{59}$$

— для постоянной температуры стерилизации

$$nV = A \exp(-E/RT)\, \tau = k\tau. \tag{60}$$

С учетом приведенных соотношений изменение количества жизнеспособных клеток в объеме жидкости в зависимости от режимов тепловой обработки (сочетание T и τ) и термической устойчивости микроорганизмов записывается следующим образом:

— для случая с переменной температурой стерилизации:

$$N = N_0 \exp(-\nabla)\left[1 + \nabla + \frac{\nabla^2}{2!} + \ldots + \frac{\nabla^{m-1}}{(m-1)!}\right], \tag{61}$$

— для случая с постоянной температурой стерилизации:

$$N = N_0 \exp(-k\tau)\left[1 + k\tau + \frac{(k\tau)^2}{2!} + \ldots + \frac{(k\tau)^{m-1}}{(m-1)!}\right]. \tag{62}$$

Уравнение (62) можно использовать для расчета количества жизнеспособных клеток в момент времени τ в заданном объеме жидкости, подвергаемой стерилизации в изотермических условиях. Оно помогает уточ-

нить тип (одноударный или многоударный) обрабатываемой популяции микроорганизмов. Это можно сделать путем сравнения экспериментальных данных, отражающих зависимость $N=f(\tau)$, с данными, рассчитанными по уравнению (62) для одноударных, двухударных и т. д. систем. Очевидно, что при $d=1$ кривая гибели клеток представляет собой экспоненту, а при дальнейшем увеличении d до 2, 3, 4 и т. д. она все больше будет отклоняться от экспоненциальной и приближаться к S-образной кривой.

Необходимо отметить, что значения удельной скорости гибели спор зависят только от температуры, а при изотермических условиях стерилизации могут рассматриваться в качестве постоянных величин, характерных для популяции данного вида. Это является одним из преимуществ рассмотренной модели.

В настоящее время получены данные об изменении в зависимости от температуры значений удельной скорости гибели спор некоторых микроорганизмов, наиболее часто встречающихся в микробиологических производствах и отличающихся повышенной термической устойчивостью (Bac. megatherium, Bac. mycoides, Bac. stearothermophilus и др. [123, 145]).

Существование в реальных производствах S-образных кривых отмирания микроорганизмов в тепловом поле свидетельствует о необходимости тщательной оценки пригодности режимов стерилизации, разработанных и оказавшихся высокоэффективными в лабораторных условиях. Часто лабораторные эксперименты, проводимые с разбавленными гомогенными суспензиями микроорганизмов, указывают на экспоненциальную кривую отмирания, в то время как на производстве отмечается S-образная кривая. На практике это приводит к необходимости «ужесточения» лабораторных режимов, увеличению времени выдержки (при $t=\text{const}$) в 2—3 раза или к соответствующему повышению температуры ($\tau_в=\text{const}$) (см. [44, 50, 51]).

Приведенный далеко не полный перечень моделей, описывающих процесс инактивации микроорганизмов под действием тепла, позволяет не только представить их многообразие и разнохарактерность (различие в исходных посылках, используемом математическом аппарате и др.), но и оценить некоторые возможности прак-

тического использования таких моделей, особенно в практике микробиологических производств. Следует отметить, что тип применяемой модели, как правило, не только зависит от существа решаемой задачи и ее особенностей, но и имеет черты установившихся традиций. Примером служат соотношения, широко используемые в практике пищевых производств и базирующиеся на понятиях смертельного времени, стерилизующего эффекта и др. Такие соотношения основаны преимущественно на предположении о том, что гибель клеток в тепловом поле подчиняется экспоненциальному закону, хотя в последние годы накоплено много фактов, указывающих на весьма частые отклонения кривых отмирания от экспоненты. Попытки учесть эти данные в традиционно существующих моделях заслуживают сами по себе положительной оценки, однако не устраняют другой существенный недостаток, заключающийся в том, что для характеристики термоустойчивости микроорганизмов и эффективности режимов стерилизации используются показатели (Z, τ_{10}), зависящие от температуры.

В то же время очевидно, что переход к достаточно строгим количественным зависимостям предъявляет повышенные требования к характеристикам термоустойчивости. В этом плане более предпочтительны методы, основанные на изучении термодинамических характеристик микроорганизмов, например энергии активации. Следует, однако, подчеркнуть, что уравнения, заимствованные из кинетики химических реакций и примененные к процессу инактивации микроорганизмов, теряют ясный физический смысл, а соответствующие константы термоустойчивости можно рассматривать лишь как формализованные характеристики, полезные для анализа процессов термической стерилизации.

3.2. Химическая стерилизация

Известно, что многие химические вещества тормозят или полностью подавляют рост микроорганизмов. С позиций решаемой нами задачи интерес представляют только вещества, обладающие бактерицидными свойствами и вызывающие гибель клеток. Эти вещества по химической структуре исключительно неоднородны. Известны попытки классифицировать их по механизму

действия [146], однако при этом отмечается определенная условность такого подхода, не охватывающего соединения с неизвестным или недостаточно ясным механизмом действия. Тем не менее мы рассмотрим этот подход, опираясь преимущественно на данные, опубликованные в работах [146, 148].

Главным объектом действия антимикробных веществ на микроорганизмы является ДНК. Первая группа таких веществ включает соединения, химически изменяющие основания в молекуле ДНК. Например, под действием азотистой кислоты происходит окислительное дезаминирование некоторых оснований ДНК. В результате аденин превращается в гипоксантин, цитозин — в урацил, гуанин — в ксантин. Гидроксиламин и гидразин реагируют преимущественно с цитозином. К этой же группе соединений относятся окись этилена и этилметилсульфонат, алкилирующие атомы азота в основаниях ДНК и вызывающие нарушения в спаривании оснований спирали ДНК. Во вторую группу входят вещества, реагирующие с молекулой ДНК между соседними парами оснований (например, профлавин и бромид этидия).

Бактерицидное действие многих соединений может проявляться и без поступления их внутрь микроорганизма. Они влияют на физиологические функции цитоплазматической мембраны, после чего микробная клетка теряет способность к размножению. Часто действие подобных веществ проявляется в нарушении осмотического барьера микробной клетки. Таким действием обладают фенолы, крезолы, нейтральные мыла, ПАВ. Клеточные мембраны состоят в основном из липидов и белка, расположенных послойно. Детергенты имеют полярное строение, их молекулы содержат как липофильные (длинные углеводородные цепочки или ароматические кольца), так и гидрофильные ионизированные группы. Накапливаясь в липопротеидных мембранах (также имеющих полярную структуру), детергенты нарушают функции последних. С детергентами по действию сходны некоторые полипептидные антибиотики (полимиксин, колистин, бацитрацин, субтилин) и антимикробные вещества растительного происхождения.

Некоторые тяжелые металлы (медь, серебро, ртуть и др.) уже в низкой концентрации действуют как сильные ферментные яды (олигодинамическое действие). В виде солей, а также в форме органических соединений они связывают SH-группы ферментов и тем самым изменяют третичную и четвертичную структуру молекулы. Блокируется также функциональная сульфгидрильная группа кофермента А. Фторуксусная кислота блокирует цикл трикарбоновых кислот.

Одним из наиболее сложных типов антимикробного действия обладают антиметаболиты. Они представляют собой соединения, которые по структуре настолько близки к предшественникам и промежуточным соединениям, что могут «подменять» их действие и включаться в метаболизм микроорганизма. Механизмы действия антиметаболитов, или антагонистов метаболитов, различные. Некоторые из них связываются с активными центрами ферментов вместо естественного субстрата, хотя сами и не могут участвовать в фер-

ментативной реакции. Эта конкуренция с промежуточными соединениями и предшественниками количественно выражается индексом ингибирования, который равен соотношению концентраций антиметаболита и промежуточного соединения (или предшественника), при котором рост микроорганизмов составляет 50% максимальной величины [146]. Одну из наиболее интересных групп антиметаболитов представляют некоторые антибиотики, например азосерин (антагонист глутамина) и циклосерин (антагонист D-аланина).

Как показывают многочисленные экспериментальные данные, влияние изменения концентрации стерилизующего вещества на скорость гибели микроорганизмов можно выразить соответствующим коэффициентом [134]. Чем больше его величина, тем быстрее гибнут микроорганизмы при повышении концентрации стерилизующего вещества. Отмечается, что, когда этот коэффициент велик, даже незначительное изменение соответствующих условий может привести к резкому изменению эффективности действия стерилизующего вещества. Время, за которое погибает определенная часть культуры, обратно пропорционально концентрации, а величина $C^n\tau$ часто имеет постоянное значение. Таким образом, при равной степени выживания для двух отличающихся режимов

$$C_1^n k\tau_1 = C_2^n k\tau_2, \tag{63}$$

где C — концентрация стерилизующего вещества; n_k — концентрационный коэффициент; τ — время, необходимое для выживания заданной части культуры.

Из соотношения (63) следует, что

$$n_k = \frac{\lg(\tau_2/\tau_1)}{\lg(C_1/C_2)}. \tag{64}$$

При химических методах деконтаминации вещества, обладающие бактерицидным действием, применяют в газообразном (парообразном) и аэрозольном состояниях, а также в виде пен. Для количественной характеристики бактерицидной активности деконтаминантов часто пользуются величиной $C\tau_{100}$, т. е. произведением концентрации химического вещества на время, необходимое для уничтожения всех микроорганизмов. В табл. 13 приведены средние расчетные значения $C\tau_{100}$ [5].

Остановимся на некоторых деконтаминантах, наиболее широко применяющихся в практике микробиоло-

Таблица 13. **Средние расчетные значения $C\tau_{100}$ [в мг/(л·ч)] газообразных деконтаминантов**

Деконтаминант	Вегетативные клетки	Споры в суспензии	Высушенные споры
Формальдегид	28	250	3500
Бромистый метил	39000	333000	493000
Окись этилена	2300	16600	32700
Карбоксид	23000	166000	327000
Фреоксид (Криоксид)	20700	150000	295000
Т-газ	2600	18500	36500
Окись пропилена	9200	66500	131000
β-Пропиолактон	1,1	10,0	13,2

гических лабораторий и производств. Неоднократно отмечалась эффективность действия окиси этилена против всех видов микроорганизмов. Даже в самых неблагоприятных для деконтаминации условиях полная деструкция спор при действии этой окиси достигается через 18 ч. Экспериментально показано, что бактериальные споры в 100—1000 раз более резистентны к теплу и к обычным химическим деконтаминантам (фенолы, хлорсодержащие вещества), чем вегетативные микробы. При действии окиси этилена эта разница не наблюдается: споры погибают практически за такое же время, что и вегетативные клетки [101].

Весьма эффективным деконтаминантом является β-пропиолактон. В эксперименте показано, что это вещество примерно в 25 раз эффективнее формальдегида, в 4000 раз — окиси этилена и в 50 000 — бромистого метила.

В микробиологической промышленности газовая деконтаминация еще не нашла широкого применения [47], хотя известны случаи успешного ее использования в медицине и пищевой промышленности. Например, с помощью окиси этилена стерилизуют агар, пептон, крахмал, различные сахара, декстрин, гликоген.

Обычно интенсивность распространения паров деконтаминанта оценивают по коэффициенту молекулярной диффузии:

$$D_{\text{н}} = 0{,}647/M_{\text{в}}, \qquad (65)$$

где $D_{\text{н}}$ — коэффициент молекулярной диффузии газа (пара) в воздухе при 0° С и давлении 1015 ГПа; характеризует число молекул

газа, проходящих через единицу поперечного сечения объема в единицу времени при градиенте концентрации, равном единице; $M_в$ — молекулярная масса соединения.

Если принять за единицу значение коэффициента диффузии формальдегида, то соответствующие относительные значения $D_н$ для паров других контаминантов составят: бромистый метил 0,564; β-пропиолактон 0,648; окись пропилена 0,723; окись этилена и препараты на ее основе 0,826.

Как показывает опыт, накопленный в микробиологических лабораториях, перечисленные деконтаминанты в зависимости от различных условий можно использовать для стерилизации приборов, малогабаритного оборудования, фильтров для очистки воздуха и жидкостей, различных датчиков, боксов и др. В последние годы весьма интенсивно в практику внедряется применение различных комбинаций антимикробных веществ [5].

3.3. Стерилизация ионизирующим излучением

Для действия ионизирующих излучений характерны следующие моменты [64]. На биологические объекты действуют кванты и частицы с энергиями от сотен до миллионов электрон-вольт, способные разорвать любые виды химических связей. Поглощение энергии излучений происходит во всех встречающихся на их пути молекулах независимо от строения последних. Микроорганизмы не имеют способов полезного использования ионизирующих излучений в основном из-за мощности и универсальности действия этих излучений. Подробное рассмотрение механизмов процессов, наблюдаемых при взаимодействии ионизирующих излучений с микроорганизмами, не входит в нашу задачу. Остановимся лишь на некоторых вопросах, характеризующих отношение микробов к излучению как к одному из летальных факторов. Рассмотрим некоторые модели [64, 126].

Известно, что при поглощении и переносе энергии излучения образуется большое число химически измененных молекул. При этом существенное значение для радиационного поражения клетки имеет лишь самая незначительная часть молекул. Этот вывод следует из результатов изучения зависимости эффективности действия излучений (инактивация фермента, фага, клетки

и др.) от дозы облучения, наглядно представляемой в виде так называемых дозовых кривых. Распределение ионизаций в клетке или облучаемом веществе имеет статистический характер. Вероятность $P_к$ возникновения $k_и$ ионизаций в некотором объеме $V_и$ (при среднем числе $n_и$ ионизаций в единице объема) равна:

$$P_к = \frac{(n_и V_и)^{k_и}}{k_и!} \exp(-n_и V_и), \tag{66}$$

где $k_и$ — целое число (1, 2, 3...); $V_и$ — чувствительный объем или мишень, он может совпадать или не совпадать с общим объемом объекта (молекула, вирус, бактериальная клетка).

Если для гибели клетки необходимо, чтобы в объеме $V_и$ возникло не менее $k_и$ ионизаций, то микроорганизмы с числом ионизаций меньше $k_и$ останутся жизнеспособными. Общее число выживших объектов (микроорганизмов) равно:

$$N = N_0 \exp[-n_и V_и)\left[1 + n_и V_и + \frac{(n_и V_и)^2}{2!} + \right.$$

$$\left. + \ldots + \frac{(n_и V_и)^{m-1}}{(m-1)!}\right] \tag{67}$$

или

$$N = N_0 \exp(-n_и V_и) \sum_{k_и=0}^{m-1} \frac{(n_и V_и)^{k_и}}{k_и!}. \tag{68}$$

Количество выживших одноударных микроорганизмов, у которых в объеме $V_и$ не произошло ионизаций, равно:

$$N = N_0 \exp(-n_и V_и) \tag{69}$$

или

$$N = N_0 \exp(-k_и D_0 V_и), \tag{70}$$

где D_0 — доза облучения.

Величина объема $V_и$ для одноударных микроорганизмов равна:

$$V_и = \ln(N_0/N)/k_и D_0. \tag{71}$$

Для большого количества разнообразных белков, ферментов, гормонов и фагов величина $V_и$, вычисленная по уравнению (71), хорошо согласуется с дан-

ными, полученными с помощью прямых методов измерения [64].

Изучено действие ионизирующей радиации на микроорганизмы, в том числе и для количественной оценки эффективности режимов стерилизации [64], что имеет прямое отношение к обсуждаемой нами проблеме. Проведена экспериментальная проверка теоретической модели, в которой предполагалось, что при радиационной стерилизации должна существовать пропорциональная зависимость между интенсивностью контаминации предметов микроорганизмами и дозой облучения этих предметов:

$$P_{\text{и}} = \prod_{i=1}^{r_{\text{и}}} \exp\left[-a\,(O,\ i)\left\{1-\left[1-\exp\left(-k_i D_0\right)\right]^{n_i}\right\}\right], \qquad (72)$$

где $P_{\text{и}}$ — вероятность отсутствия на облучаемой поверхности микроорганизмов с разной чувствительностью $r_{\text{и}}$ к дозе радиации D_0; $a(0,\ i)$ — среднее число организмов с радиочувствительностью разного типа к облучению; k_i и n_i — параметры, характеризующие резистентность микроорганизмов к радиационной инактивации в соответствии с многоударным механизмом отмирания; последний предполагает следующее соотношение:

$$N/N_0 = 1 - \left[1 - \exp\left(-k_i D\right)\right]^{n_i}, \qquad (73)$$

где N_0 — количество жизнеспособных микроорганизмов до воздействия радиации ($\tau = 0$); N — то же, но после воздействия радиации в момент времени τ.

В качестве высокорадиорезистентной модели использовали споры Bac. pumilus E 601, а низкорадиорезистентной модели — клетки Serratia marcescens. Капсулы с различной обсемененностью испытуемых образцов в смеси и отдельно облучали различными дозами γ-лучей от источников ^{60}Co и определяли число сохранивших жизнеспособность микроорганизмов. Результаты статистической обработки экспериментальных данных полностью подтвердили правильность теоретических представлений.

3.4. Фильтрующая стерилизация

Принципиальные положения теории рассмотрим на примере стерилизации воздуха, содержащего бактерии, волокнистыми материалами. Расчет процессов и аппаратов, обеспечивающих получение стерильного воздуха методом фильтрации, требует знания размера фильтрую-

щихся частиц, скорости подачи воздуха, объемной доли волокна, коэффициента полезного действия одного волокна, необходимой эффективности очистки и др. Основным параметром, выражающим связь между скоростью движения воздуха, производительностью фильтра и степенью очистки, является так называемый суммарный коэффициент осаждения бактериальных частиц, учитывающий влияние различных механизмов фильтрации [96]. Этот коэффициент рассматривается с позиций следующих механизмов: инерционного осаждения; прямого захвата частиц; диффузионного осаждения; осаждения гравитационными силами; осаждения электростатическими силами. Главная трудность в математическом описании осаждения аэрозольных частиц на волокнистых материалах заключается в незнании фактического поля скоростей в системе волокон [85, 87].

Применительно к волокнистым фильтрам влияние сил инерции, как правило, не учитывают [96] из-за небольшой массы фильтруемых частиц. Влиянием сил электростатического притяжения также пренебрегают. Однако экспериментально показано, что 70% спор Bac. subtilis имеют положительный заряд, 15% — отрицательный, остальные электронейтральны.

При количественной оценке различных механизмов задержки микроорганизмов обычно допускают, что в заданном пространстве перпендикулярно потоку воздуха расположено одно цилиндрическое волокно, а поток воздуха вокруг этого цилиндра ламинарный. Анализ проводят для двумерного пространства.

Инерционное осаждение. Полагают, что величина сопротивления движению сферической частицы, движущейся с определенной скоростью в потоке воздуха, подчиняется уравнению Стокса, а движение частицы подчиняется уравнениям:

$$\left(\frac{\pi}{6}\right) d_ч^3 \rho_ч \frac{dV_ч}{d\tau} = -\frac{3\pi\mu_в d_ч}{C_ч}(V_ч - V_в), \qquad (74)$$

$$\frac{C_ч \rho_ч d_ч^2}{18\mu_в} \frac{dV_ч}{d\tau} = -(V_ч - V_в), \qquad (75)$$

где $d_ч$ — диаметр частицы (микроорганизма); $\rho_ч$ — плотность частицы; $V_ч$ — скорость движения частицы в потоке воздуха; $V_в$ — скорость воздуха; $\mu_в$ — вязкость воздуха; $C_ч$ — поправочный коэффициент Каннингема для ламинарного потока.

Теоретическое значение задерживающей способности одного волокна вследствие инерционного осаждения частиц определяют из уравнения

$$\eta_0' = b_в/d_f, \tag{76}$$

где η_0' — задерживающая способность одного волокна вследствие инерционного осаждения частиц; $b_в$ — ширина потока воздуха; d_f — диаметр волокон.

При этом часто пользуются соотношением

$$\psi = C_ч\rho_ч d_ч^2 V_в/(18\mu_в d_f), \tag{77}$$

в котором ψ рассматривается как инерционный параметр. Имеются сообщения о том, что $\eta_0'=0$ при $\psi={}^1/_{16}$, однако в случае волокон нецилиндрической формы имеют место и иные соотношения. Если считать, что при $\psi={}^1/_{16}$ скорость воздуха является критической, то

$$V_{кр} = 1{,}125\mu_в d_f/\left(C_ч\rho_ч d_ч^2\right). \tag{78}$$

На основе уравнения (78) обычно строят графики $V_{кр}=\varphi(d_ч)$, по которым легко анализировать влияние диаметра волокон и частиц на критическую скорость осаждения частиц.

Графики такого типа полезны при оценке ориентировочного значения $V_{кр}$, ниже которого инерционным осаждением частиц можно пренебречь.

Захват частиц. Масса бактерий весьма незначительная. Это дает основание полагать, что они движутся по направлению, близкому к направлению линий тока. Если взвешенные в потоке воздуха частицы задерживаются при соприкосновении с волокнами, то говорят о явлении захвата. Задерживающую способность одного волокна в этом случае определяют из уравнения

$$\eta_0'' = \frac{1}{2\left(2-\ln N_{Re}\right)}\left[2\left(1+N_ч\right)\ln\left(1+N_ч\right)-\left(1+N_ч\right)+\frac{1}{1+N_ч}\right], \tag{79}$$

где η_0'' — задерживающая способность одного волокна вследствие явления захвата; $N_ч=d_ч/d_f$; $N_{Re}=d_f V_в\rho_в/\mu_в$; $\rho_в$ — плотность воздуха.

В уравнении (79) принято, что скорость воздуха в набегающем потоке $V_в$ равна скорости потока воздуха V вокруг цилиндра.

Диффузионное осаждение. Мелкие частицы способны к броуновскому движению и по мере удаления от места входа могут задерживаться на поверхности волокон [96]. При ширине потока частиц, равной $2b_0$,

$$\eta_0''' = \frac{1}{2(2-\ln N_{\mathrm{Re}})}\left[2\left(1+\frac{2b_0}{d_f}\ln\left(1+\frac{2b_0}{d_f}\right)-\right.\right.$$
$$\left.\left.-\left(1+\frac{2b_0}{d_f}\right)+\frac{1}{1+2b_0/d_f}\right]. \qquad (80)$$

При этом

$$\frac{2b_0}{d_f}=\left[1{,}12\,\frac{2(2-\ln N_{\mathrm{Re}})D_d}{Vd_f}\right]^{1/3}, \qquad (81)$$

где $D_d = Ck_{\mathrm{в}}T/3\pi\mu_{\mathrm{в}}d_{\mathrm{ч}}$; $k_{\mathrm{в}}$ — константа Больцмана; T — абсолютная температура; D_d — коэффициент диффузии.

Задерживающая способность волокон при одновременном независимом действии трех механизмов равна:

$$\eta_0 = \eta_0' + \eta_0'' + \eta_0'''. \qquad (82)$$

Известна и физическая модель для расчета общего коэффициента осаждения [52], которая основана на допущениях: единичное волокно перпендикулярно потоку аэрозоля; режим течения воздуха ламинарный; все анализируемые параметры имеют два измерения.

После некоторых преобразований уравнения (79) и (80) можно упростить [96]:

$$\eta_0'' \simeq N_{\mathrm{ч}}^2 N_{\mathrm{Re}}^{1/8}, \qquad (83) \qquad \eta_0''' \simeq N_{\mathrm{Sc}}^{-2/3} N_{\mathrm{Re}}^{11/18}, \qquad (84)$$

где $N_{\mathrm{Sc}} = \dfrac{\mu_{\mathrm{в}}}{\rho D_d}$ — число Шмидта.

Известно, что проникновение микроорганизмов через волокнистые фильтры снижается с увеличением толщины последних [53]:

$$\lg(N_1/N_2) = (k_\Phi/2{,}3)\,L_\Phi, \qquad (85)$$

где N_1 — количество микроорганизмов в воздухе, поступившем в фильтр; N_2 — то же после фильтра; k_Φ — постоянная фильтрации, являющаяся функцией скорости воздуха, пористости фильтра, размера волокон, величины микроорганизмов и др.; L_Φ — толщина фильтра (глубина слоя фильтрующей насадки). Толщина фильтров, обеспечивающая 10-кратное снижение концентрации микроорганизмов в воздухе, приведена в работе [124].

Обращает на себя внимание тот факт, что при скорости воздуха 300 см/с толщина фильтрующей насадки, обеспечивающая десятикратное снижение концентрации

микроорганизмов (L_{90}), при очистке от фага почти в 3 раза больше, чем при очистке микробных клеток. Этот экспериментально подтвержденный факт имеет исключительно важное значение в производстве лизогенных культур, особенно в тех случаях, когда воздух, подаваемый в фильтры и далее в ферментеры, содержит клетки вирулентного фага.

Природа процесса фильтрации такова, что для каждого фильтра можно подобрать скорость воздуха, при которой эффективность фильтрации окажется минимальной. При низких скоростях на частицу действуют гравитационные, диффузионные и электростатические силы. Степень их действия обратно пропорциональна скорости воздуха. При высоких скоростях наиболее значительную роль играют силы инерции. Их действие прямо пропорционально скорости воздуха. На основании имеющихся данных можно считать, что частицы фага наиболее эффективно задерживаются фильтром при низких скоростях воздуха, но, как правило, менее эффективно, чем бактерии.

Требования к задерживающей способности фильтров можно определить из уравнения

$$N_1/N_2 = x_в Q_в \tau / P_в, \tag{86}$$

где $x_в$ — концентрация микроорганизмов в поступающем на фильтр воздухе; $Q_в$ — объемная скорость потока воздуха через фильтр; τ — продолжительность фильтрации; $P_в$ — допустимая вероятность прохождения посторонних микроорганизмов через фильтр.

Очевидно, что

$$L_{90} = \lg (x_в Q_в \tau / P_в). \tag{87}$$

Известно и другое соотношение [124]:

$$L_{90} = \frac{0{,}79\,(1-\alpha)\,d_f}{\alpha\,(1+4{,}5\alpha)\,\eta_{от}}, \tag{88}$$

где α — объемная доля волокон в фильтре; d_f — диаметр волокна; $\eta_{от}$ — эффективность отдельного волокна.

Как отмечалось выше, получена зависимость и для определения критической скорости, ниже которой силы инерции перестают действовать на микроорганизмы.

Полагают, что при конструировании фильтров целесообразно ориентироваться на микроорганизмы размером 0,5 мкм и более [124]. Для расчета перепада дав-

ления на волокнистом фильтре приводится формула [124]

$$\Delta P_{\Phi} = (QL_{\Phi}/A_{\Phi})\left(\mu_{в}/d_{f}^{2}\right) 64\alpha^{1,5}\,(1 + 56\alpha^{3})\,K_{\Phi}QL_{\Phi}/A_{\Phi}; \qquad (89)$$

где ΔP_{Φ} — перепад давления; A_{Φ} — площадь поперечного сечения фильтра; K_{Φ} — постоянная фильтра.

3.5. Герметизация оборудования и коммуникаций

«Герметизация — обеспечение непроницаемости стенок и соединений, ограничивающих внутренние объемы аппаратов, машин, сооружений для жидкостей и газов» [БСЭ, изд. 2-е, т. 11, с. 137]. Это определение применительно к обсуждаемой нами проблеме, по-видимому, должно быть конкретизировано в плане обеспечения непроницаемости для посторонней микрофлоры технических систем, аппаратов, трубопроводов, входящих в них узлов и элементов, которые работают в асептических условиях. Таким образом, должна обеспечиваться определенная степень непроницаемости как сложных систем, так и их отдельных элементов.

До рассмотрения основных расчетных методов необходимо отметить некоторые особенности микробиологических производств при решении вопросов герметизации. Первая из них заключается в наличии многочисленных видов герметизирующих элементов, условия работы которых существенно различаются (торцевые уплотнения валов мешалок, фланцевые соединения, уплотнения штоков запорной арматуры с помощью сильфонов и др.). Вторая особенность состоит в том, что нарушение необходимой степени герметизации многих элементов и узлов часто ведет к контаминации, которую, к сожалению, можно обнаружить только после достижения определенной концентрации посторонних микроорганизмов.

Для монтажных схем ферментаторов (МСФ), герметизация которых представляется наиболее сложной и крайне необходимой, характерно наличие большого числа фланцевых соединений с уплотняющими элементами различного типа (шип — паз; плоские; с канавками и др.), различного условного прохода, имеющими различные площади контакта, качество уплотняющих поверхностей и затяжки и др. Используют также резьбовые

соединения бобышек, с помощью которых в аппарат введены различные датчики. Герметизирующим элементом служат резьба и прокладка между опорной площадью датчика и бобышки. Поскольку уплотняющие поверхности бобышек имеют различные диаметры и соответственно различные площади уплотнений, то при установке датчиков на уплотняющие элементы необходимо создавать различные удельные напряжения для обеспечения требуемой герметичности.

Следует отметить, что герметизирующие элементы разных типов даже в течение одного рабочего цикла эксплуатируются при отличающихся значениях рабочего давления и температуры. В качестве уплотняющего материала в замке вентилей (седло — клапан) используют различные по свойствам материалы: резину, паронит, фторопласт, металл и др. Поэтому в зависимости от вида уплотнения и качества его изготовления в замке для обеспечения герметичности требуется прикладывать к шпинделю вентилей различные усилия, которые в реальных условиях эксплуатации арматуры не контролируются и могут колебаться в достаточно широком диапазоне. В то же время усилие, необходимое для надежного запирания арматуры, зависящее от площади герметизирующего элемента, материала и других характеристик, не является постоянным.

Большое влияние на эффективность герметизации монтажных схем аппаратов оказывают уплотнения для ввода вала перемешивающего устройства. В торцевых уплотнениях герметизирующими элементами служат прокладки в посадочном гнезде аппарата, сильфон, трущиеся пáры из различных материалов. Постоянная вибрация вала, изменение температуры деталей торцевого уплотнения в ходе эксплуатации аппарата (режим культивирования, термическая стерилизация и др.) являются факторами, несомненно, способствующими дегерметизации и не поддающимися строгой количественной характеристике.

Практические потребности пищевой и микробиологической промышленности требуют знания фактической эффективности герметизации и прогнозирования возможного числа отказов герметизирующих элементов. Остановимся на состоянии теоретических разработок в этой области.

Наиболее распространены работы, посвященные определению условий достижения герметичности лишь отдельных элементов, например фланцевых соединений [13, 92]. Достаточно полно изучено влияние на эффективность герметизации фланцевых соединений давления [92], температуры [70], качества уплотнительных поверхностей [17, 38], вида среды в трубопроводе [39, 69], монтажно-сборочных погрешностей [20, 59, 89], прокладочного материала [33, 38]. В соответствии с существующими современными теоретическими представлениями герметичность при контакте двух уплотнительных поверхностей может быть обеспечена при условии, если зазор между ними будет меньше какой-то весьма малой величины, определяемой явлениями на границе раздела фаз (среда — уплотнение — атмосфера) и размерами молекул рабочей среды. Реальные уплотнительные поверхности имеют определенную шероховатость. Даже при самой тщательной обработке остаются бороздки глубиной более 0,1 мкм [17].

Шероховатость обусловливает существование капиллярных каналов, через которые может поступать рабочая среда. По теории протекание среды через капиллярные каналы можно предотвратить при условии, если наибольший размер канала будет равен диаметру молекулы среды, а при образовании на твердых уплотнительных поверхностях прочного адсорбированного слоя среды герметичность будет также сохраняться и при зазоре, равном трем диаметрам молекул [30]. Для жидкостей характерно явление облитерации, поэтому зазор, обеспечивающий герметичность соединения, может быть еще больше [71].

Повышение требований к герметичности фланцевых соединений привело к необходимости установки упругого уплотнительного элемента (прокладки) между уплотнительными поверхностями, значительно повышающего эффективность герметизации в эксплуатационных условиях. Если представить, что зазор между уплотнительными поверхностями фланцевого соединения и прокладкой состоит из нескольких круглых отверстий, то истечение через соединение можно сравнить с истечением через капиллярные трубки [30]. Отмечается, что в этом случае для определения утечек применим закон Пуазейля [38]:

$$G_y = A_н \frac{(P_1 - P_2)\, d_т^4}{\mu L_т}, \qquad (90)$$

где G_y — утечка через трубку; $A_н$ — коэффициент; P_1 и P_2 — разность давлений по ту и другую сторону трубки; $d_т$ — диаметр трубки; μ — вязкость среды; $L_т$ — длина трубки.

После преобразования уравнения (90) получается упрощенная формула для расчета утечек (G_y) через зазор $h_з$ фланцевого соединения:

$$G_y = \frac{\pi \bar{d} h_з^3 \Delta P}{12 \mu b_{уп}}, \qquad (91)$$

где $\bar{d}$ — средний диаметр уплотнительных поверхностей; ΔP — перепад давления; $b_{уп}$ — ширина уплотнительных поверхностей.

Это уравнение не учитывает всех явлений, происходящих в малых зазорах. Например, из него следует, что нельзя предотвратить утечку до тех пор, пока зазор $h_з$ не будет равен нулю (все остальные величины имеют конечные значения). Имеющиеся экспериментальные данные опровергают справедливость этого положения.

В нашей стране исследования герметичности фланцевых соединений были начаты с изучения мягких паронитовых прокладок, распространенных на некоторых микробиологических производствах. При этом большинство работ сводилось к оценке необходимого удельного давления (q_y) на прокладке:

$$q_y = \varphi P_{ср}^a g, \qquad (92)$$

где φ, a, g — коэффициенты, определяемые опытным путем.

Определенный интерес представляет следующее соотношение [18]:

$$q_y = (C_{пр} + K_д P_{ср})/\sqrt{b_п}, \qquad (93)$$

где $C_{пр}$ — *постоянный коэффициент, зависящий от материала прокладки*; $K_д$ — коэффициент, учитывающий влияние давления среды на удельное давление при данном материале прокладки; $P_{ср}$ — рабочее давление среды; $b_п$ — ширина прокладки.

Для расчета удельного давления предложена формула [55]

$$q_y = \eta_ж P_{ср} \left(m_э + \frac{D_1^2}{D_2^2 - D_1^2} \right), \qquad (94)$$

где $\eta_ж$ — коэффициент жесткости фланцевого соединения; $m_э$ — коэффициент запаса плотности ($m_э = 1{,}4 \div 1{,}6$); D_1 и D_2 — внутренний и наружный диаметр прокладки соответственно.

Указанные исследования относятся к статическим условиям работы фланцевых соединений.

Некоторые авторы рассматривают работу фланцевых соединений в динамических условиях [21]. Предложена также формула для расчета удельного давления на полимерной прокладке фланцевых соединений в зависимости от погрешностей сборки [20]:

$$q_{\text{у}} = \eta_{\text{ж}} P_{\text{ср}} \left[1 - D_1^2/\left(D_2^2 - D_1^2\right)\right] \left(k_{\text{у}_1} + k_{\text{у}_2} - 1\right) + V_{\text{д}} \tau_{\text{от}}, \qquad (95)$$

где k_{y_1} и k_{y_2} — коэффициенты, учитывающие степень снижения величины удельного давления на прокладке при существовании монтажно-сборочных погрешностей; $V_{\text{д}}$ — скорость снижения удельного давления на прокладке; $\tau_{\text{от}}$ — время наработки на отказ.

Справедливо отмечено [13], что многие авторы при расчете фланцевых соединений учитывают влияние температуры, крутящих моментов и других факторов на прочность фланцевых соединений, но не рассматривают влияние этих факторов на долговечность. Анализ литературы показал [68], что имеются рекомендации по использованию смазок, лаков с целью повышения эффективности работы фланцевых соединений, а также новых типов прокладок: спиральнонавитых, многослойных и др.

Арматура, используемая в микробиологической промышленности, состоит из различных герметизирующих элементов. В их числе фланцевые соединения, сальниковое или сильфонное уплотнение шпинделя, замок (седло — клапан). Все эти элементы имеют различную наработку на отказ. В то же время вентиль как систему герметизирующих элементов рассматривают, как правило, только с позиций необходимости достижения равного удельного давления в прокладках фланцевых соединений.

Анализ опубликованных работ показывает, что имеющиеся данные для обеспечения требуемой эффективности герметизации по необходимому удельному давлению относятся в основном лишь к определенной конструкции, конкретному материалу и определенным условиям эксплуатации и не могут быть распространены на другие виды фланцевых соединений с уплотнительным материалом без проведения дополнительных экспериментальных работ. Именно этот недостаток характерен для расчет-

ных методов не только фланцевых соединений, но и других видов уплотнений. Например, получены соотношения для расчета и прогнозирования работы подвижных контактных уплотнений [83], а также для сильфонов [81, 82]. Однако полученные формулы можно применять, как правило, только при условии знания микрогеометрических и физико-химических характеристик поверхностей, а также рабочих условий и геометрии конструкционных узлов. Очевидно, что такие уравнения нельзя использовать для оценки эффективности герметизации элементов иной конструкции, эксплуатируемых в отличающихся условиях.

Важно отметить, что ни один из известных методов не позволяет оценить эффективность герметизации сложных технических систем, работающих в асептических условиях, а тем более прогнозировать ожидаемое число дегерметизаций различных элементов и узлов за определенный промежуток времени при эксплуатации. Отсутствие в настоящее время количественных соотношений между конструктивно-технологическими параметрами герметизирующих элементов и количественными показателями их надежности в производственных условиях приводит к тому, что эксплуатационная надежность герметизирующих элементов в условиях микробиологических производств не является контролируемым технологическим параметром. Более того, отсутствуют статистические данные, полученные в условиях эксплуатации и необходимые для количественной характеристики эффективности герметизации отдельных герметизирующих элементов, узлов, аппаратов и технических систем в целом.

3.6. Недостатки существующих расчетных методов

В предыдущих разделах мы рассмотрели практически все основные процессы, реализация которых на практике связана непосредственно с достижением и поддержанием асептических условий. Наибольшую практическую значимость для микробиологических производств имеют процессы термической стерилизации, применяемые при деконтаминации оборудования и различных жидкостей, процессы герметизации и стерилизации воздуха методом фильтрации. Менее широко в промышленных масштабах применяются процессы химической деконтаминации, однако они оказываются незаменимыми, когда необходима стерилизация контрольно-измеритель-

ных приборов, уникального лабораторного оборудования, которые не выдерживают обработки паром.

Еще меньшее значение для микробиологических производств имеет метод деконтаминации с помощью радиоактивных излучений. Из-за своей сложности, необходимости обеспечения специфических требований по технике безопасности метод не нашел широкого применения ни в лабораторных, ни в заводских условиях, хотя перспектива строго дозированного введения энергии в материальные потоки весьма заманчива.

Каков же уровень теоретической проработки рассмотренных нами процессов и какие практические задачи он позволяет решать при создании и поддержании асептических условий в технических системах микробиологических производств? Необходимо сразу отметить, что теория еще не дает возможности комплексного рассмотрения на количественной основе всех тех процессов, реализация которых на практике непосредственно связана с получением чистых культур микроорганизмов. Еще не в полной мере разработан математический аппарат, который позволял бы сравнивать эффективность обработки различных материальных потоков (воздух, вода, питательная среда, пеногаситель и др.) для выявления «слабых» режимов и методов с позиций обеспечения требований асептики.

Не представляется достаточно ясным механизм инактивации микроорганизмов под действием тепла и химических соединений. Не в полной мере разработаны вопросы как теории, так и практики в области кинетики инактивации микробных популяций. Крайне недостаточно экспериментальных данных о константах термической и химической устойчивости контаминантов. Еще довольно широко распространены на практике методы расчета эффективности режимов термической стерилизации, базирующиеся на таких характеристиках, как Z и τ_{10}, которые при строгом рассмотрении не являются константами. В то же время не нашли широкого практического применения на микробиологических производствах методы расчета, основанные на знании энергии активации и удельных скоростей гибели микроорганизмов.

В целом опубликованные в литературе методы можно охарактеризовать как первые, далеко не завершенные попытки количественно описать процессы отмирания популяций микроорганизмов под действием различных летальных факторов. Примеры их использования для решения практических задач рассмотрены в следующих разделах.

3.7. Примеры практического использования некоторых расчетных методов

Рассмотрим на примерах использование некоторых из существующих расчетных методов для решения практических задач, связанных с получением чистых культур микроорганизмов. В первую очередь остановимся на методах оценки эффективности процессов термической стерилизации, основанных на использовании критерия стерилизации [42, 85, 145]. Необходимо отметить, что в данном разделе вопросы термической стерилизации рассматриваются только с позиций инактивации микрофлоры без учета других процессов, в том числе и изменения свойств стерилизуемых жидкостей.

При этом предполагается, что требуемая температура достигается и поддерживается во всех точках стерилизуемых объемов. Такой подход мы считаем методически оправданным, поскольку он способствует лучшему усвоению принципов расчета и облегчает восприятие последующих разделов, в которых термическая стерилизация рассматривается как комплекс различных процессов, а расчетные методы учитывают особенности конкретных практических задач.

Расчет эффективности стерилизации при постоянной температуре. Стерилизация в изотермических условиях на практике встречается крайне редко. Однако в методическом отношении полезно рассмотреть последовательность расчетов применительно именно к этому наиболее простому случаю.

Пример. Известно, что питательная среда стерилизуется при двух режимах: при 120° С 60 мин и при 125° С 30 мин. Требуется оценить эффективность стерилизации и определить наиболее жесткий режим.

Решение. Эффективность режимов стерилизации определим по значениям критерия стерилизации, рассчитанным по уравнению $\nabla = k\tau$. Из табл. 10 находим, что $k_{120°C} = 1{,}48$ мин$^{-1}$. Тогда $\nabla_{120°C} = 1{,}48 \cdot 60 = 88{,}8$. Соответственно $k_{125°C} = 4{,}57$, а $\nabla_{125°C} = 4{,}57 \cdot 30 = 137{,}1$. Таким образом, режим стерилизации при 125° С более эффективный, поскольку он обеспечивает бо́льшее, чем при 120° С, *значение критерия стерилизации. В то же время оба режима* вполне достаточны для обеспечения стерильности, поскольку каждый из них позволяет достичь значений $\nabla > 80$.

Пример. Гарантированная стерильность питательной среды объемом 100 л достигается при 125° С и выдержке 20 мин. Исходная обсемененность среды спорами Bac. stearothermophilus составляет $1 \cdot 10^6$ клеток на 1 мл. Требуется обеспечить такую же эффективность стерилизации при 120° С в аппарате вместимостью 1 м^3 при обсемененности $1 \cdot 10^7$ клеток на 1 мл.

Решение. 1) Масштабирование осуществляем по величине показателя нестерильности N, определяемой из выражения $\nabla = \ln N_0/N$, откуда $N = N_0 \exp(-\nabla)$.

2) В соответствии с 1): $N' = N''$, т. е.

$$N_0' \exp(-\nabla') = N_0'' \exp(-\nabla'').$$

Для первого режима

$$N_0' = 1 \cdot 10^6 \cdot 100 \cdot 10^3 = 1 \cdot 10^{11} \text{ клеток}$$

$$\nabla' = k_{125° C} \tau'.$$

Поскольку $k_{125°C} = 4{,}57$ (см. табл. 10), то $\nabla' = 4{,}57 \cdot 20 = 91{,}4$. Для второго режима: $N_0'' = 1 \cdot 10^7 \cdot 1 \cdot 10^6 = 10^{13}$ клеток. Значение ∇'' требуется определить. Очевидно, что $\exp(\nabla'') = \dfrac{N_0''}{N_0'} \exp(\nabla')$, откуда $\exp(\nabla'') = 10^2 \exp(91{,}4)$, а $\nabla'' = 96$. Так как $k_{120°C} = 1{,}48$ (см. табл. 10), то $\tau'' = \dfrac{\nabla''}{k_{120°C}} \approx 65$ мин.

Таким образом, при втором режиме требуется выдержать питательную среду в течение 65 мин при 120° С, чтобы обеспечить такую же эффективность ее стерилизации, как и при первом режиме.

Рассмотренный пример показывает также, что критерий стерилизации не может быть параметром масштабирования при изменении условий стерилизации за счет обсемененности питательной среды, ее объема или температуры стерилизации. Более правильно масштабировать по показателю нестерильности $N=N_0 \exp(-\nabla)=$ $=\text{const}$.

Расчет эффективности стерилизации при переменной температуре. Наиболее принципиальным моментом в расчете эффективности стерилизации при переменной температуре является учет интегрального теплового эффекта, достигаемого на стадиях нагревания, выдержки и охлаждения стерилизуемого объекта (жидкости, оборудование и др.). Типичный график изменения температуры при периодическом способе стерилизации представлен на рис. 1. Такие зависимости характерны для процессов термической стерилизации ферментаторов или других аппаратов, для всех процессов автоклавирования, а также периодической стерилизации жидкостей в промышленных аппаратах.

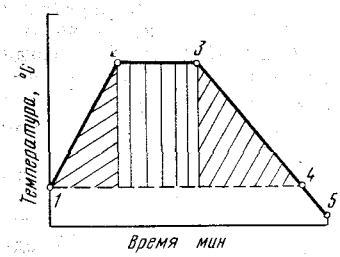


Рис. 1. Изменение температуры во времени при периодическом способе термической стерилизации.

Точка *1* соответствует температуре, которую принимают в качестве начальной при расчете стерилизующего эффекта. За начало отсчета рекомендуют принимать $t=100°$ С [145]. Участок *1—2* соответствует периоду нагревания жидкости до температуры стерилизации; участок *2—3* — периоду выдержки при постоянной температуре; участок *3—4* — периоду охлаждения от температуры стерилизации до $t_4=t_1$; участок *4—5* — периоду охлаждения до температуры технологического процесса, например ферментации, и не учитывается при оценке суммарного стерилизующего эффекта.

Обычно в подавляющем большинстве лабораторных и промышленных регламентов при характеристике режимов стерилизации, связанных с инактивацией посторонней микрофлоры, фиксируют только период выдержки, например 120° С в течение 60 мин. При этом отмечают, что в условиях лаборатории этот режим обеспечивает требуемую эффективность подавления посторонней микрофлоры. Как правило, именно этот режим и рекомендуют при переходе на промышленные аппараты. Даже применительно только к процессу инактивации посторонней микрофлоры такой подход не обоснован, поскольку приводит к необъективной характеристике фактической эффективности режимов стерилизации, необоснованному перерасходу пара и увеличению продолжительности подготовки промышленных аппаратов к работе.

Из рис. 1 следует, что

$$\Sigma\nabla = \nabla_н + \nabla_в + \nabla_{охл}, \qquad (96)$$

где $\nabla_н$ — значение критерия стерилизации на стадии нагревания; $\nabla_в$ — то же на стадии выдержки; $\nabla_{охл}$ — то же на стадии охлаждения; $\Sigma\nabla$ — суммарное значение критерия при периодическом способе стерилизации.

Задача заключается в том, чтобы объективно оценить суммарный стерилизующий эффект на всех трех стадиях, в качестве необходимого условия полагая, что требуемая температура достигается одновременно во всех точках стерилизуемого объема. При наличии точек с меньшей температурой расчет ведут применительно к ним.

Для практики микробиологических производств наиболее простым и удобным является метод, опубликованный в работе [145] и созданный на основе работ [106, 107, 123]. Существо метода заключается в следующем. Предполагают, что стерилизующий эффект, который следует учитывать, обеспечивается лишь при значениях температуры 100° С и выше. Гарантированная стерильность достигается при значениях $\nabla = 40$. Споры контаминантов, подлежащие инактивации, имеют такие же значения констант термической устойчивости, как и споры Bac. stearothermophilus штамм 1518, для которых $A = 1{,}6 \cdot 10^{36}$ с$^{-1}$, а $E = 284{,}3$ кДж/моль. Предполагают также, что для аппаратов периодического действия при их стерилизации (как с жидкостями, так и без них) зависимость температуры от времени на стадиях нагревания и охлаждения можно считать линейной.

Значения критерия стерилизации при меняющейся температуре определяют из соотношения

$$\nabla_д = \nabla_т \frac{\tau_{н(охл)}}{t_{ст} - 100} \cdot a, \qquad (97)$$

где $t_{ст}$ — температура стерилизации, при которой выдерживаются аппарат и (или) продукт; $\nabla_т$ — табличное значение критерия стерилизации (см. табл. 11), достигаемое при условии, что все точки аппарата (продукта) нагреваются от 100° С до $t_{ст}$ (или охлаждаются от $t_{ст}$ до 100° С) со скоростью 1° С/мин; $\nabla_д$ — действительное значение критерия стерилизации с учетом отклонения от стандартной скорости нагревания 1° С/мин; a — поправочный коэффициент, равный 1° С/мин; $\tau_{н(охл)}$ — продолжительность изменения температуры от 100° С до $t_{ст}$ и от $t_{ст}$ до 100° С соответственно.

Таким образом, отношение $\tau_{н(охл)}/(t_{ст}-100)$ учитывает отклонение от стандартной скорости нагревания, увеличивая $\nabla_д$ при уменьшении скорости нагревания и снижая $\nabla_д$ при повышении скорости нагревания.

Пример. Жидкость в процессе стерилизации нагревалась 20 мин от 100 до 120° С. Требуется определить достигнутое при этом значение критерия стерилизации.

Решение. По табл. 11 находим, что при 120° С $\nabla_т = 7{,}5$, а с учетом формулы (97)

$$\nabla_д = \nabla_т \frac{\tau_н}{t_{ст} - 100} = 7{,}5 \frac{20}{20} = 7{,}5.$$

Пример. Жидкость в процессе стерилизации охлаждалась от 130 до 100° С 60 мин. Необходимо оценить стерилизующий эффект стадии охлаждения по величине критерия стерилизации.

Решение. По табл. 11 находим, что при 130° С $\nabla_т = 72{,}3$, а с учетом поправки на скорость охлаждения

$$\nabla_д = 72{,}3\,\frac{60}{30} = 144{,}6.$$

В рассмотренном примере даже на стадии охлаждения обеспечивается необходимый стерилизующий эффект ($\nabla > 100$).

Пользуясь приведенным выше методом, можно решать практические задачи, постоянно возникающие и в микробиологических лабораториях и особенно при переходе на промышленные аппараты.

Пример. Жидкость стерилизуется в пробирке методом автоклавирования по режиму: нагревание от 100 до 130° С 5 мин; выдержка при 130° С 10 мин; охлаждение от 130 до 100° С 10 мин. Требуется определить значение критерия стерилизации и оценить эффективность режима автоклавирования.

Решение. По аналогии с предыдущим примером действительное значение критерия стерилизации составит: для стадии нагревания $\nabla_н \cong 72{,}3\,\frac{5}{30} \approx 12$; для стадии охлаждения $\nabla_{охл} = 72{,}3\,\frac{10}{30} = 24{,}3$. Для стадии выдержки $\nabla = k_{130°\,С}\,\tau = 14{,}8 \cdot 10 = 148$.

Таким образом, $\Sigma\nabla = 184{,}3$, т. е. значительно превышает рекомендуемые значения $\nabla = 80 \div 100$. Очевидно, что такой режим нуждается в корректировке. Поскольку на стадиях нагревания и охлаждения достигается значение критерия стерилизации, равное 36,3, то при необходимости обеспечения $\nabla = 80$ следует ограничить период выдержки временем, гарантирующим значение $\nabla_в = 80 - 36{,}3 = 43{,}7$. Следовательно, $\tau_в = \frac{43{,}7}{14{,}8} = 2{,}5$ мин. Именно в этом случае режим стерилизации будет эффективным и не приведет к необоснованному увеличению продолжительности автоклавирования и перерасходу пара.

Значение экономии тепла и сокращения продолжительности простоев аппаратов периодического действия возрастает с увеличением масштабов производства.

Однако уже на этапах лабораторных разработок возникают такие принципиальные вопросы, как обеспечение стандартности воздействия теплового фактора при решении задачи инактивации посторонней микрофлоры. Рассмотрим пример необходимости решения таких вопросов.

Пример. При отработке режимов стерилизации лабораторных аппаратов вместимостью 10 л оказалось, что вполне эффективным может считаться следующий режим: продолжительность нагревания от 100 до 132° С — 5 мин, выдержки при 132° С — 1 мин, охлаждения от 132 до 100° С — 10 мин.

Требуется обеспечить равную эффективность стерилизации аппарата вместимостью 10 м^3, для которого продолжительность нагре-

вания от 100 до 120° С 10 мин, а продолжительность охлаждения от 120 до 100° С 20 мин.

Решение. В соответствии с изложенной выше методикой находим для аппарата вместимостью 10 л, что $\nabla_н = 107{,}6\frac{5}{32} = 16{,}8$; $\nabla_в = k\tau = 18{,}6 \cdot 1 = 18{,}6$; $\sum \nabla_{охл} = 107{,}6\frac{10}{32} = 33{,}6$; $\Sigma \nabla = 69$.

Для аппарата вместимостью 10 м³ $\nabla_н = 7{,}5\frac{10}{20} \cong 3{,}7$; $\nabla_{охл} = 7{,}5\frac{20}{20} = 7{,}5$, их сумма равна 11,2. На стадии выдержки требуется обеспечить значение $\nabla_в = 69 - 11{,}2 = 57{,}8$. Таким образом, для достижения требуемой эффективности стерилизации необходимо выдержать аппарат при 120° С в течение $\tau_в = \frac{57{,}8}{1{,}48} = 39$ мин.

Приведенные примеры, охватывающие далеко не полный круг задач, встречающихся на практике при достижении стерильности аппаратов и жидкостей, указывают на целесообразность использования существующих расчетных методов, которые позволяют количественно оценить эффективность различных режимов стерилизации. Применение величины критерия стерилизации при приближенных расчетах и показателя нестерильности при более точных расчетах весьма полезно для решения вопросов, связанных со сравнительной оценкой различных режимов, а также с достижением равного стерилизующего эффекта в самых различных ситуациях: при изменении масштабов аппаратов, объемов жидкостей, их обсемененности и др.

В последующих разделах рассмотренные выше методы расчета используются при решении более сложных задач, стоящих ближе к практике функционирования микробиологических производств.

4. ТЕРМИЧЕСКАЯ СТЕРИЛИЗАЦИЯ ОБОРУДОВАНИЯ И КОММУНИКАЦИЙ

4.1. Особенности аппаратов, трубопроводов, узлов и элементов, работающих в асептических условиях

В технических системах, работающих в асептических условиях, должна обеспечиваться стерилизуемость всех точек внутренних объемов аппаратов, коммуникаций, арматуры, контрольно-измерительных приборов (КИП), непосредственно соприкасающихся с чистыми культурами целевых микроорганизмов или со стерильными материальными потоками. С этой целью в каждой точке необходимо создать требуемую температуру и поддерживать ее в течение заданного промежутка времени.

Одна из особенностей многих современных микробиологических производств заключается в том, что стерилизуемость должна обеспечиваться (даже в пределах одного цеха) в километрах трубопроводов и в сотнях (иногда тысячах) кубических метров замкнутого пространства, образующегося в результате монтажа самых разнообразных по конструктивному оформлению элементов и узлов, а также аппаратов и коммуникаций. Как показывает накопленный опыт, их взаимное пространственное расположение является исключительно важным при практическом достижении стерилизуемости, что во многом определяется качеством монтажного проекта и его реализации в металле.

Уже отмечалось, что аппарат (например, ферментатор), а также совокупность расположенных на нем арматуры, КИП, коммуникаций, подключающих его к магистральным трубопроводам, целесообразно рассматривать как специфическую техническую систему, в которой применительно к рассматриваемой в данном разделе задаче должна обеспечиваться стерилизуемость всех точек внутреннего объема. Термин «обвязка», укоренившийся среди специалистов заводов и проектно-конструкторских организаций, недостаточно точен и требует замены. Мы используем термин «монтажная схема аппарата» [43], или сокращенно МСА. Анализ МСА, используемых при ферментации (посевной аппарат, ферментатор, емкость для стерильного пеногасителя и др.), показывает, что они состоят в основном из одинаковых, типовых элементов. Рассмотрим одну из монтажных схем, применяемых в самых различных микробиологических производствах для ферментаторов, не имеющих нижнего спуска (рис. 2). Все материальные линии этой МСА оснащены термическими затворами, целью которых является предупреждение возможности проникновения контаминирующей микрофлоры во внутреннюю полость аппарата [85, 98]. Эта задача решается путем постоянной подачи пара в каждый из трубопроводов, связывающих ферментатор с материальными линиями или атмосферой, при одновременном удалении образующейся пароконденсатной смеси в канализацию. Такие термические барьеры, хотя и приносят известную пользу в решении задач асептики, но не всегда являются достаточно надежной гарантией сохранения стерильности под-

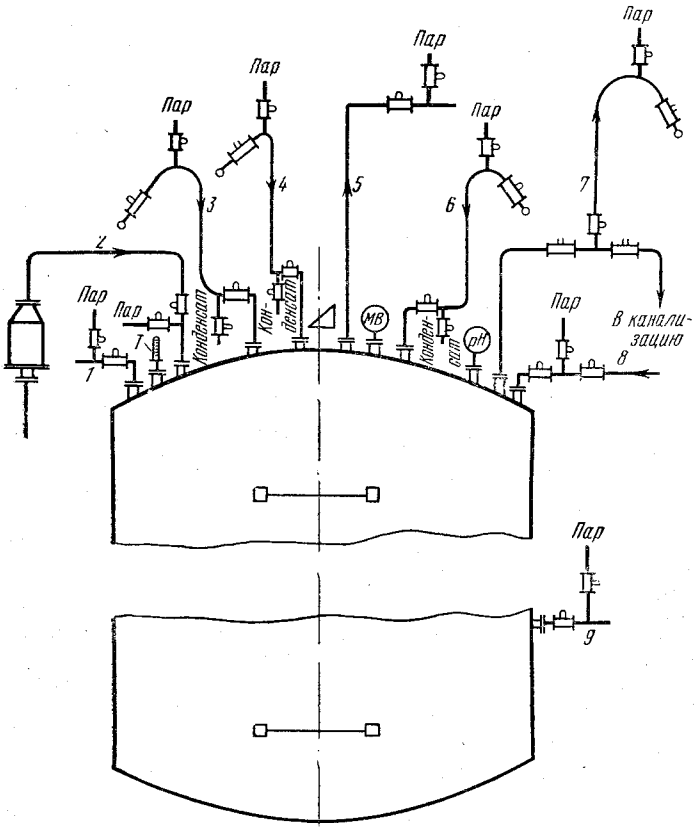


Рис. 2. Принципиальная монтажная схема ферментатора без нижнего спуска:

1 — ввод посевного материала; *2* — подача стерильного сжатого воздуха; *3* — подача стерильной питательной среды; *4* — подача стерильного пеногасителя; *5* — удаление отработанного технологического воздуха; *6* — подача жидких добавок; *7* — выдача готового продукта; *8* — подача моющего раствора; *9* — пробоотборник; *T* — термометр; *МВ* — мановакуумметр; pH — pH-метр.

ключаемого трубопровода, а следовательно, и защищаемого аппарата. Загрязнение стерильных сред может произойти при возможных пропусках в уплотнении «седло — клапан» вентиля, отсекающего полость трубопровода от внутренней полости аппарата, в которой поддерживаются асептические условия, при внесении посевного материала или добавок в малых количествах, а также при реализации других процессов.

Рассмотрим особенности оформления типовых узлов МСА и магистральных трубопроводов, приведенных на рис. 2, с позиций обеспечения их стерилизуемости.

Открытые трубные окончания. На рис. 2 это узлы ввода посевного материала, удаления отработанного технологического воздуха, отбора проб культуральной жидкости из ферментатора. На материальном трубопроводе установлен вентиль, отделяющий полость аппарата от полости трубопровода, оканчивающегося в непосредственной близости у аппарата. Как правило, трубопровод имеет незначительную протяженность, часть его на участке от вентиля до открытого трубного окончания имеет уклон. В отрезок трубопровода на расстоянии 50—150 мм от фланца вентиля к открытому трубному окончанию подведен пар. Диаметр материального трубопровода может изменяться от 5 до 100 мм и более.

Большие трудности возникают при обеспечении стерилизуемости этих узлов, поскольку открытое трубное окончание не дает возможности создать в нем давление (а значит, и температуру), необходимое для эффективной стерилизации [43]. Распространенные в практике резиновые шланги на трубных окончаниях для подключения посевных бутылей и пробоотборников еще более затрудняют задачу обеспечения стерильности указанного выше узла, поскольку нормальное обслуживание шлангов существенно ограничивает поток пара, подаваемого через трубное окончание в шланг и далее в атмосферу или канализацию.

Примером открытых трубных окончаний могут служить и узлы (так называемые продувки), обеспечивающие удаление отработанного конденсата из коллекторного трубопровода стерильной питательной среды, стерильных добавок, пеногасителя и др. Стерилизуют открытое трубное окончание (см. рис. 2), как правило, вместе с аппаратом. При этом пар подают из аппарата со сбросом паро-конденсатной смеси в атмосферу. Во время эксплуатации узлов посева и отбора проб на рабочем режиме ферментатора пар постоянно поступает в участок трубопровода, соединяющийся с атмосферой.

Как показывает практика работы многих микробиологических производств, температура при стерилизации в трубных окончаниях не контролируется. В связи с этим не представляется возможной количественная оценка степени завершенности процесса стерилизации с помощью величины критерия стерилизации или показателя нестерильности. Поэтому для обеспечения равной эффективности стерилизации всех точек внутренних поверхностей оборудования, коммуникаций, арматуры и КИП [41] вполне обоснована и целесообразна постановка вопроса об экспериментальном изучении температурных полей таких элементов МСА.

Типовой термический затвор. Как отмечалось, на стерильных трубопроводах, связывающих аппарат со стерильными коллекторами, устанавливают два вентиля, между которыми осуществляются подвод пара для стерилизации затвора и удаление отработанного конденсата. Коллектор может располагаться на различном по высоте уровне относительно штуцера аппарата, к которому подключен термический затвор. Последний имеет уклон в сторону элемента узла, расположенного ниже. Пар в этот затвор подводится на расстоянии 50—150 мм от фланца вентиля, расположенного или у

аппарата, или у коллектора, но всегда в наивысшую точку. Конденсат удаляется из нижней части затвора. Длина термического затвора может изменяться от десятков сантиметров до нескольких метров. Диаметр материальных трубопроводов варьирует от 10 до 150 мм.

Типовой термический затвор является примером наиболее распространенных монтажных решений по подключению ферментатора к магистральным жидкостным трубопроводам. В таких узлах схемы принципиально должны предусматривать свободный доступ пара во все точки стерилизуемых внутренних полостей трубопроводов и арматуры, что само по себе является одной из необходимых предпосылок достижения и поддержания требуемой температуры. Однако на практике часто сталкиваются с такими фактами, когда одно и то же монтажное решение для коммуникаций различного диаметра не обеспечивает равного стерилизующего эффекта. Последний совершенно необходим и вытекает из принципа обеспечения равной эффективности всех процессов, от реализации которых зависит достижение асептических условий в ферментаторе [41]. Например, из практики известно, что в трубопроводах меньшего диаметра трудней достичь требуемой степени стерильности.

Узлы такого типа стерилизуют одновременно с аппаратом в период подготовки к эксплуатации. При этом пар подают из магистрального трубопровода в аппарат. Вентили на линии пара и на материальном трубопроводе перед аппаратом открыты полностью. Вентиль на линии конденсата приоткрывают так, чтобы в стерилизуемой линии обеспечивалось требуемое давление. При работе аппарата пар подают непрерывно от точки ввода к конденсатной линии. Вентили на входе в аппарат и у магистрального стерильного трубопровода закрыты. Термические затворы такого типа препятствуют загрязнению аппаратов. Для обеспечения стерилизуемости и ее сохранения представляет интерес взаимное расположение всех вентилей на участке аппарат — стерильный магистральный трубопровод. Температурные поля этих узлов до сих пор изучены недостаточно, температура в полостях вентилей не контролируется.

Коллекторные трубопроводы. Решения такого типа характерны для большинства жидкостных магистральных трубопроводов, к которым подключена группа ферментаторов или других аппаратов, работающих в асептических условиях. Примером может служить схема коммуницирования коллекторного трубопровода для стерильной питательной среды, соединяющего установку непрерывной стерилизации (УНС) с ферментаторами. УНС типовая и применяется на многих микробиологических производствах. Для стерилизации коллекторного трубопровода предусмотрена подача острого пара по направлению от УНС к аппаратам и даже к линиям удаления отработанного конденсата в течение промежутка времени, указанного инструкциями и гарантирующего по опыту работы конкретных производств или экспериментальным данным стерилизацию коллекторов подачи стерильной питательной среды. Аналогично оформляются и коллекторы различных стерильных жидкостей, подаваемых в ферментаторы в течение рабочего цикла (растворы сахаров, пеногасители и др.), а также система коллекторных трубопроводов, предназначенная для подачи чистого посевного материала из инокуляторов в промышленные ферментаторы. Отметим, что, как

правило, температура не контролируется ни в одной из точек стерилизуемого объема таких коммуникаций.

Принципиальная схема коллекторного трубопровода, работающего в асептических условиях, представлена на рис. 3, *а*. Стериль-

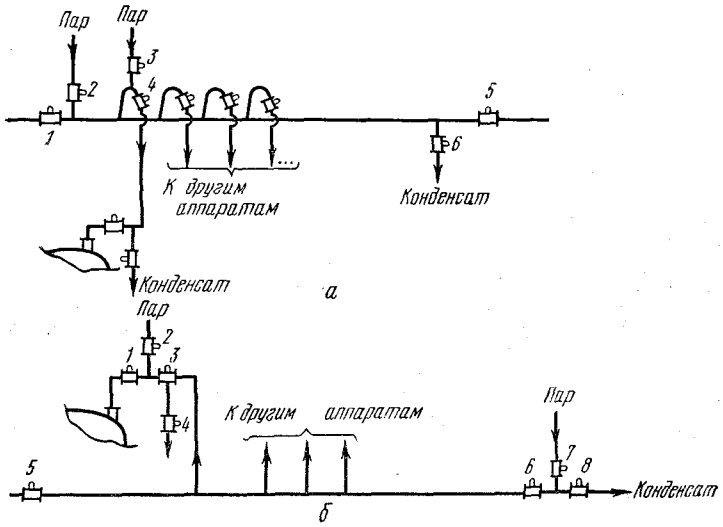


Рис. 3. Принципиальные схемы оформления типового коллекторного трубопровода, работающего в асептических условиях:
а — вариант верхней разводки коммуникаций; *б* — вариант нижней разводки коммуникаций.

ный продукт подается через вентиль *1* в коллектор и по отводам типа «лебединая шея» поступает в аппараты. Коллектор стерилизуют путем подачи пара через вентили *1—3* в коллектор с удалением образующегося конденсата в конденсатопровод через вентили *4*, *5* и *6*. Обычно стерильность таких магистралей поддерживают при закрытом вентиле *1* с подачей пара через вентиль *2* по направлению к вентилям *5* и *6*. При этом отработанный конденсат удаляют через вентиль *5* или вентиль *6*, либо через оба вентиля одновременно. Последний вариант предпочтителен, поскольку уменьшает возможность загрязнения магистрального трубопровода из линии конденсата при пропусках уплотнения «седло — клапан» вентиля *6*. При обработке по схеме рис. 3, *б* конденсат удаляют через вентили *4*, *6*, *8*. Очевидно, что во время стерилизации закрытие одного из вентилей создает тупик, стерилизуемость которого часто вызывает затруднения. Следует обратить внимание читателя на необходимость существенного повышения надежности узлов подключения всех стерильных коммуникаций к конденсатопроводам, в которых постоянно поддерживается избыточное давление, почти равное по величине давлению пара, используемого для стерилизации оборудования и коммуникаций. В последних после термической

обработки создается практически атмосферное давление, а отсекающие вентили на границе стерильный коллектор — конденсатопровод становятся, таким образом, единственным барьером на пути загрязнений. Создание термических затворов в таких узлах с установкой дублирующих вентилей существенно снижает вероятность загрязнения стерильных линий за счет микрофлоры, содержащейся в конденсатопроводах (рис. 3, *б*). Разработка новых конструктивных элементов, гарантированно исключающих возможность загрязнения, должна явиться предметом пристального внимания технологов, конструкторов и проектантов.

Весьма своеобразно в настоящее время решается узел подачи стерильного сжатого воздуха в ферментаторы. Стерильный участок как бы состоит из двух частей, разделяемых отключающим вентилем (см. рис. 2). Участок трубопровода от него до фильтра и сам фильтр стерилизуют, как правило, с помощью химического метода (например окисью этилена, формалином или β-пропиолактоном). Участок трубопровода после вентиля до штуцера на аппарате стерилизуют острым паром; при этом стерилизуемость зависит от диаметра трубопроводов и их взаимного расположения.

Немало сложностей в достижении стерилизуемости МСФ возникает при конструктивном решении нижних спусков ферментаторов, предназначаемых как для выдачи чистых культур микроорганизмов, так и для удаления забракованных серий, а также конденсата после стерилизации самих аппаратов. Дублирование вентилей и обеспечение свободного доступа пара во все точки внутренних полостей и в этом случае обеспечивают как стерилизуемость нижних спусков, так и поддержание асептических условий в течение рабочего цикла ферментаторов.

В аппаратах без нижнего спуска задача транспортировки культуральной жидкости в материальную линию, а также слива брака или промывных вод в канализацию решается с помощью типового узла (рис. 4). Необходимо отметить, что в этом варианте обеспечивается дублированная защита ферментатора по линии как культуральной жидкости, так и канализации. Последовательная установка двух вентилей не только снижает вероятность загрязнения ферментатора контаминантами, но и обеспечивает возможность эффективной стерилизации каждого из участков независимо от ферментатора, т. е. при закрытом вентиле *2*.

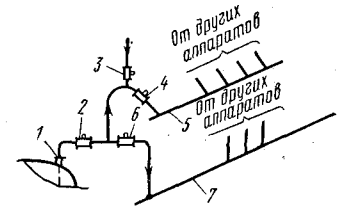


Рис. 4. Типовой узел для выдачи культуральной жидкости из ферментаторов без нижнего спуска:

1 — штуцер трубы передавливания; *2* — вентиль, отключающий трубу передавливания от коллектора культуральной жидкости и коллектора канализации; *3* — вентиль на линии пара; *4* — вентиль, отключающий ферментатор от коллектора чистой культуральной жидкости *5*; *6* — вентиль, отключающий ферментатор от канализационного коллектора *7*.

Рассмотрение типовых наиболее распространенных в микробиологической промышленности узлов и элементов монтажных схем позволяет выделить наиболее «слабые» из них, стерилизуемость которых вызывает сомнение и требует экспериментального изучения температурных полей. В первую очередь следует

назвать открытые трубные окончания, в которых невозможно создание необходимого давления насыщенного водяного пара (узлы отбора проб, введения посевного материала, удаления отработанного технологического воздуха). К «слабым» относят и так называемые тупиковые места, которые возникают в отглушенных штуцерах, а также на участках трубопроводов при неудачном размещении на них запорной и регулирующей арматуры, точек ввода пара и удаления конденсата. Таким образом, «слабые элементы» могут появляться в монтажных схемах не только из-за дефектов монтажного проекта, но и вследствие конструктивных недостатков таких типовых элементов, как арматура, штуцера и др.

Несмотря на исключительные требования некоторых микробиологических производств к защите от посторонней микрофлоры, на практике часто сталкиваются с техническими решениями, не отвечающими в полной мере этим требованиям. Существующие конструкции промышленных ферментаторов заимствованы в основном из химической технологии и поэтому не отвечают требованиям обеспечения гарантированной стерилизуемости всех точек внутренних полостей. Дополнительные элементы и узлы во внутренних полостях аппаратов усложняют достижение требуемых температур, особенно в тупиковых полостях. Такими встроенными элементами являются змеевики для охлаждения культуральной жидкости, барботеры для подачи воздуха, трубы передавливания, перемешивающие устройства, датчики различных КИП. При введении через аппаратный штуцер термометра сопротивления или трубы передавливания образуется кольцевая тупиковая полость; сложности в стерилизации возникают и при установке манометра с разделительной мембраной на типовых штуцерах.

Иногда тупиковые полости образуются штуцером и частью трубопровода до вентиля и по длине превышают 1000 мм. Кольцевые тупиковые полости по длине, как правило, не больше длины штуцера, но разность между диаметрами составляет от одного до десятков миллиметров. Тупиковые полости могут располагаться в любой части аппарата: на верхней крышке, цилиндрической части, днище. В тупиковых полостях могут создаваться застойные зоны, и они в этих случаях будут источниками контаминации. Как показывает практика, особое внимание при стерилизации следует уделять полостям, расположенным на днище аппаратов. При стерилизации аппаратов температура в тупиковых полостях не контролируется. Как правило, термометры сопротивления измеряют температуру в средней части полости аппаратов, в которой обеспечивается наиболее эффективный режим стерилизации. При рассмотрении особенностей стерилизации внутренних полостей пустых аппаратов можно выделить некоторые типовые конструктивные элементы, стерилизация которых затруднена.

На рис. 5 представлена полость стерилизуемого аппарата. Через штуцер *1* введена труба передавливания, которую можно использовать для заполнения аппарата стерильной питательной средой и выгрузки содержимого аппарата. Кольцевую тупиковую полость, образовавшуюся при этом, стерилизуют одновременно с аппаратом. Через штуцер *2* введен термометр сопротивления. Образовавшуюся в этом месте кольцевую тупиковую полость стерилизуют одновременно с аппаратом. Через штуцер *3* удаляется отработанный воздух. При стерилизации через него обычно подается пар

из аппарата в трубопровод или в обратном направлении. Тупиковая полость на штуцере *4* образована за счет установки манометра с разделительной мембраной. Стерилизуют эту полость одновременно с аппаратом. Пар в нее поступает из аппарата. Через штуцер *5* введен барботер для подачи воздуха. Кольцевая тупиковая полость, образовавшаяся в штуцере, аналогична полости в штуцере *1*. Штуцер *6* отглушен заглушкой. Стерилизация его производится одновременно с аппаратом паром, подаваемым в аппарат. Через штуцер *7* вводят какой-либо датчик (например, для измерения pH). Кольцевая тупиковая полость аналогична полости в штуцере *2*. Через нижний спуск *8* сливают содержимое аппарата (конденсат, культуральную жидкость и др.). При отглушенном штуцере в нем всегда будет находиться остаток жидкости, затрудняющий стерилизацию. При постоянной эксплуатации штуцер стерилизуется паром из аппарата.

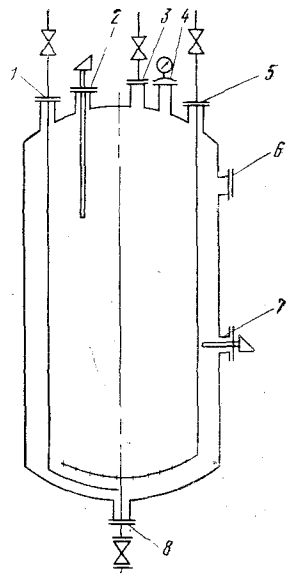


Рис. 5. Конфигурация внутренней полости ферментатора как объекта стерилизации:

1 — труба передавливания; *2* — термометр сопротивления; *3* — линия удаления отработанного воздуха; *4* — место установки манометра; *5* — место установки барботера; *6* — отглушенный штуцер; *7* — установка датчика КИП; *8* — нижний спуск.

Рассматривая особенности стерилизации различных типовых элементов и узлов монтажных схем, необходимо обратить внимание на такую характеристику, как удельная поверхность, т. е. поверхность, приходящаяся на единицу внутреннего объема элемента, в который подается пар. На рис. 6 и 7 показано изменение удельной поверхности для двух наиболее распространенных элементов: фланцевой сильфонной арматуры и штуцеров. Из приведенных графиков следует, что резкое увеличение удельной поверхности наблюдается при диаметрах арматуры и штуцеров $d_y \leqslant 40$ мм. Этот факт вызывает необходимость в тщательном экспериментальном изучении температурных полей названных элементов при малых диаметрах.

Необходимо отметить, что ни в одной из опубликованных по обсуждаемому вопросу работ не содержатся количественные характеристики, позволяющие однозначно определять те предельные расстояния между запорной арматурой, материальными трубопроводами и КИП, с одной стороны, и подводимыми к ним паропроводами, с другой, которые гарантировали бы стерилизуемость внутренних полостей перечисленных элементов. Отсутствуют рекомендации и по аналитическим методам расчета требуемых характеристик МСА. В то же время в подавляющем большинстве регламентов (лабораторных, полупромышленных и промышленных) при констатации требуемого режима стерилизации (сочетание температуры и времени

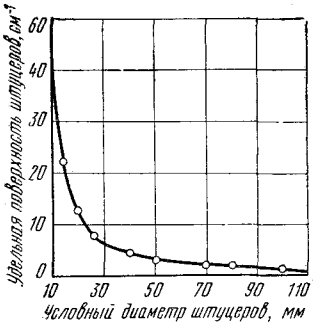


Рис. 6. Изменение удельной поверхности стандартных штуцеров ферментаторов в зависимости от диаметра.

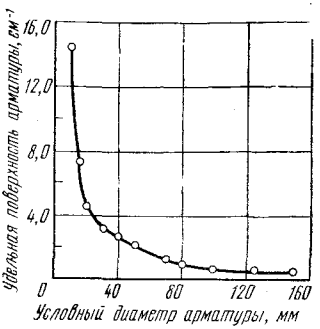


Рис. 7. Изменение удельной поверхности фланцевой сильфонной арматуры в зависимости от диаметра.

выдержки) совершенно необоснованно предполагается, что задаваемая температура стерилизации обеспечивается во всех точках стерилизуемого объема. На практике такой подход к термической стерилизации оборудования и коммуникаций приводит к недостаточно эффективной инактивации посторонней микрофлоры, а следовательно, к контаминации на различных этапах производства.

4.2. Существующие режимы и способы стерилизации

Если проанализировать существующие режимы термической стерилизации оборудования и коммуникаций, то первое, что привлекает внимание исследователей и практиков, это исключительное многообразие режимов, хотя в принципе решается одна и та же задача. Проиллюстрируем это положение примерами.

Отмечается, что стерилизация пустых аппаратов и прилегающих к ним коммуникаций осуществляется в течение 1 ч при температуре 120—126° С [10]. При указанных режимах значения критерия стерилизации меняются в диапазоне 88,8—354. В том же источнике дается и режим стерилизации линий стерильного пеногасителя: 120—124° С 1 ч, т. е. при $\nabla = 88{,}8 \div 225{,}6$. Указывается, что эффективная стерилизация реактора обеспечивается при 120° С в течение 30 мин ($\nabla = 44{,}5$), матрацных колб с ватно-марлевыми пробками — при 127° С 3 ч ($\nabla = 1332$), колб с агаром — при 110° С 30 мин ($\nabla = 4{,}89$) [3]. Считают [165] вполне приемлемым режим

стерилизации аппарата емкостью 30 л при 120° С в течение 2 ч ($\nabla = 178$). В работе [134] приведено минимальное время, необходимое для стерилизации с помощью насыщенного водяного пара при различной температуре (здесь и выше значения ∇ рассчитаны нами):

Температура, °С	Время, мин	∇
121	15	27,4
126	10	59,0
134	3	88,5

Справедливо отмечено, что одна и та же степень инактивации микроорганизмов может достигаться при бесчисленном количестве комбинаций интенсивности воздействия летального фактора (в данном случае температуры) и продолжительности его воздействия [134]. При этом указывается, что в приведенные выше значения времени необходимо вносить поправку на время, необходимое для прогрева загруженного в стерилизатор материала до заданной температуры стерилизации. Однако ничего не говорится о стадии охлаждения, доля которой в общем стерилизующем эффекте может быть весьма значительной. Отмеченные особенности, по-видимому, привели к тому, что рекомендуемые режимы обеспечивают различные, существенно отличающиеся друг от друга значения критерия стерилизации. Они позволяют также сделать вывод о том, что приводимые сочетания температуры и времени необъективно отражают действительные режимы стерилизации, так как не включают поправок на стерилизующие эффекты стадий нагревания и охлаждения в цикле автоклавирования.

При производстве антибиотиков рекомендуют стерилизовать аппараты при 125—130° С в течение 1 ч ($\nabla = 276 \div 888$), а коммуникации — при 120° С 2—4 ч ($\nabla = 178 \div 356$) [7]. При этом применительно к аппаратам предлагается отмечать начало выдержки только после достижения температуры 125° С. К сожалению, не приведены данные по количественной оценке эффективности режимов термической стерилизации и о фактическом тепловом эффекте, обеспечивающем стерильность оборудования и коммуникаций. Указывается стерилизация при 121° С и выдержке 10—20 мин ($\nabla = 18{,}3 \div 36{,}6$) [98]. Отмечено, что часть микроорганизмов будет инактивиро-

ваться в период нагревания аппаратов до максимальной температуры, а также в начальный период охлаждения аппарата.

Количественные характеристики эффективности этих стадий не приведены.

Приведенные примеры, по нашему мнению, объективно характеризуют общее положение, сложившееся в различных отраслях микробиологической промышленности при решении задач, связанных с термической стерилизацией оборудования и коммуникаций. Эти примеры позволяют сделать замечания, представляющие практический интерес. Сложившееся многообразие режимов стерилизации свидетельствует главным образом о том, что указанные режимы имеют практическую основу и не базируются на разработанных к настоящему времени теоретических основах термической стерилизации. Именно поэтому эффективность режимов, оцениваемая по значениям критерия стерилизации, варьирует в широком диапазоне (от нескольких десятков до нескольких тысяч).

Как правило, в опубликованных работах не указан интегральный тепловой эффект, учитывающий инактивирующее воздействие повышенных температур на стадиях нагревания, выдержки и охлаждения аппаратов и коммуникаций.

Существующий подход к оценке эффективности режимов стерилизации не позволяет определить эффективность, действительно необходимую для гарантированной инактивации посторонней микрофлоры. Более того, не представляется возможным осуществление обоснованного переноса отработанных в лабораториях режимов на промышленные аппараты. Простое воспроизведение режимов, учитывающих стерилизующий эффект только на стадии выдержки, приводит к значительным перерасходам пара на производстве и необоснованному увеличению продолжительности подготовки аппаратов к эксплуатации.

Особенно следует подчеркнуть тот факт, что в большинстве публикаций отсутствуют ссылки на так называемые «слабые» точки с пониженной температурой, хотя последние во многом предопределяют необходимую длительность стерилизации как аппаратов, так и коммуникаций.

4.3. Результаты экспериментального изучения стерилизуемости некоторых типовых элементов монтажных схем

Экспериментальное изучение температурных полей типовых узлов МСА представляет значительный практический интерес, поскольку позволяет получить информацию о действительных количественных характеристиках конкретных режимов стерилизации, а также выявить «слабые» точки, устранение которых необходимо при практической реализации принципа равной эффективности. Как показывает практика [46], весьма полезные данные можно получить, проводя стерилизацию на стенде. Ниже приведены основные характеристики исследованных узлов (табл. 14, рис. 8) и экспериментальные данные.

Таблица 14. **Характеристика типовых узлов коммуницируемых трубопроводов, стерилизуемость которых вызывает сомнение**

Узел на рис. 8	Место в монтажных схемах	Особенности эксплуатации
А	Подключение жидкостных трубопроводов к аппаратам	При стерилизации монтажной схемы аппарата вентиль *1* материального трубопровода открыт. Во время работы аппарата вентиль *1* закрыт; пар, подаваемый в верхней точке материального трубопровода, удаляется в конденсатную линию через вентиль *2*. Температура во внутренней полости вентиля *1* не контролируется
Б	Подача технологического воздуха в аппарат	Узел стерилизуется одновременно с аппаратом при закрытом вентиле *1*. Во время работы аппарата вентиль *1* открыт, вентиль *2* закрыт. Температура во внутренней полости вентиля *1* не контролируется
В	Пробник, посевной штуцер, выхлоп воздуха из аппаратов, продувка материальных магистральных трубопроводов	Стерилизуется одновременно с аппаратом при открытом вентиле *1* путем подачи пара из аппарата к открытому трубному окончанию. Стерильность трубного окончания при работе аппарата поддерживается при закрытом вентиле *1* путем подачи пара через вентиль *2* к открытому трубному окончанию, температура в котором не контролируется

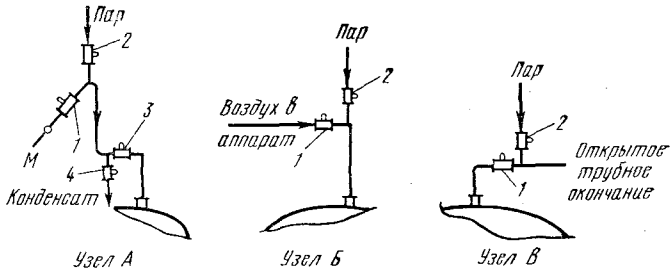


Рис. 8. Типовые узлы монтажных схем ферментаторов:

Узел *А*: *М* — магистральный трубопровод стерильной жидкости: *1, 3* — вентили на стерильном трубопроводе, подключающем ферментатор к магистральному трубопроводу; *2, 4* — вентили на линиях пара и конденсата соответственно. Узел *Б*: *1* — вентиль на линии стерильного воздуха в ферментатор; *2* — вентиль на линии пара. Узел *В*: *1* — вентиль на стерильной линии пробника (или посевного штуцера); *2* — вентиль на линии пара.

Полученные экспериментальные данные [46] позволяют утверждать, что во всех монтажных схемах, имеющих узлы типа *А* с трубопроводами и арматурой $d_у \leqslant 40$ мм, следует учитывать «слабые» точки, не гарантирующие достижение требуемой эффективности термической стерилизации. Как показывают результаты экспериментов, необходимая эффективность стерилизации может быть обеспечена, если пар будет подаваться непосредственно в корпус вентиля, а образующаяся пароконденсатная смесь будет удаляться из-под уплотнения «седло — клапан». Аналогичные результаты по стерилизуемости получены применительно к узлу *Б*. Наихудшие условия стерилизации создаются в узле *В*: для трубопроводов $d_у = 100$ мм предельно достижимой в открытом окончании является температура 100° С, а для трубопроводов $d_у = 15$ мм — 62° С.

Очевидно, что для МСА, имеющих открытые трубные окончания, продолжительность стерилизации последних должна быть значительно больше таковой для тех трубопроводов, в которых обеспечивается режим стерилизации под давлением, т. е. при более высокой температуре. Расчетным путем можно показать, что при равной обсемененности аппаратов посторонней микрофлорой продолжительность выдержки при 100 и 120° С должна различаться примерно в 100 раз при необходимости достижения равного стерилизующего эффекта.

В целом следует отметить, что условия стерилизации всех исследованных на стенде элементов и узлов полностью имитировали такие условия, применяемые в реальных МСА: давление и температура насыщенного водяного пара, взаимное расположение арматуры, трубопроводов, КИП, точек ввода пара и удаления конденсата, продолжительность выдержки. Поэтому полученные на стенде результаты можно использовать для оценки стерилизуемости некоторых узлов и элементов МСА. Например, не представляется возможным обеспечить стерилизацию МСА, включающих типовые узлы *А* и *Б* с тупиковыми полостями в вентилях, при диаметре $d_у < 50$ мм. Увеличение продолжительности выдержки не приводит к соответствующему повышению температуры в «слабых» точках. В этом случае следует изменять точки ввода пара (в корпус вентиля) и отвода конденсата (из-под уплотнения «седло — клапан»). Именно такое решение, обеспечивающее постоянный проток пара через стерилизуемую полость, гарантирует требуемую эффективность стерилизации.

4.4. Результаты экспериментального изучения стерилизуемости аппаратов

Методические подходы к изучению стерилизуемости оборудования и коммуникаций опубликованы в работе [46]. Приведем некоторые экспериментальные данные, полученные совместно с Г. Е. Скворцовым применительно к аппаратам вместимостью 63 м³.

Исследования температурных полей проведены для двух вариантов стерилизации. В первом острый пар подавали в нижнюю часть аппарата, при этом образующаяся паровоздушная смесь вытеснялась через линию удаления отработанного технологического воздуха. Во втором варианте пар подавали в верхнюю часть аппарата, а паровоздушную смесь и конденсат вытесняли через нижний спуск. Динамика изменения температуры в различных точках изучена как на стадии нагревания аппарата до температуры стерилизации, так и на стадиях выдержки и последующего охлаждения.

Размещение точек контроля температуры в полости аппарата вместимостью 63 м³ показано на рис. 9. Для контроля температуры в верхней части полости аппарата установлены термопары *1, 2* и *3* на расстоянии 30 мм от верхней крышки аппарата, термопара *1* установлена по центру аппарата, термопара *3* — на расстоянии 30 мм от вертикальной стенки, термопара *2* — посередине между термопарами *1* и *3*. Для контроля температуры в средней части полости аппарата установлены термопары *4, 5* и *6*; термопара *4* установлена по центру аппарата; термопара *6* — на расстоянии 40 мм от стенки аппарата; термопара *5* — посередине между термопарами *4* и *6*. Для измерения температуры в нижней части аппа-

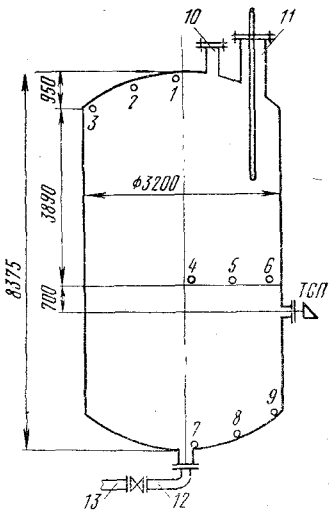


Рис. 9. Схема размещения термопар в ферментаторе вместимостью 63 м³ при экспериментальной оценке его стерилизуемости:

1—13 — места установки термопар; *ТСП* — место установки термометра сопротивления.

рата установлены термопары *7, 8* и *9* на расстоянии 30 мм от днища; термопара *7* установлена по центру аппарата, термопара *9* — на расстоянии 20 мм от вертикальной стенки аппарата; термопара *8* — посередине между термопарами *7* и *9*. В тупиковой полости штуцера для манометра с разделительной мембраной установлена термопара *10* на расстоянии 215 мм от крышки аппарата; условный диаметр штуцера 70 мм, длина полости штуцера 230 мм. Термопара *11* установлена в кольцевой тупиковой полости, образованной штуцером длиной 325 мм с внутренним диаметром 150 мм и вставленной в него трубой передавливания наружным диаметром 133 мм; термопара расположена на расстоянии 5 мм от верхней части тупика. Термопары *12* и *13* для измерения температуры установлены в линии нижнего спуска, одна — до вентиля на нижнем спуске, вторая — после вентиля. Термометр сопротивления в этом аппарате установлен на 700 мм ниже уровня термопар *4—6*.

При изучении распределения температур использовали термопары, изготовленные из хромель-копеля. Диаметр электродов 0,5 мм. В качестве вторичных приборов при измерении температур на стенде использовали прибор КСПЗ со шкалой 0—150° С, класс точности 0,5, а при измерении температуры в аппаратах использовали потенциометры типа ЭПП-09М3 с классом точности 0,5 и пределами измерения температуры 0—150° С. Для получения объективных данных о действительной температуре, достигаемой в стерилизуемых полостях, все термопары калибровали в соответствии с известными рекомендациями [94]. Давление измеряли манометрами ОБМ-1-160 с классом точности 1,6 и ценой деления 0,1 кгс/см². Режим нагревания и выдержки в аппаратах устанавливали по показаниям термометров сопротивления ТСП-1. В качестве вторичных приборов использовали ЭМП-209М с классом точности 1 и пределом измерения температуры 0—150° С.

Известно, что эффективность стерилизации аппаратов во многом зависит от температуры стенки оборудования [66]. В то же время в процессе стерилизации аппаратов температура измеряется, как правило, в центре обечайки, т. е. в наиболее благоприятной точке. Поэтому мы изучили различия между температурой стенки аппаратов и температурой в их внутренней полости. Для этого в непосредственной близости около термопар *6* и *12* смонтировали термопары *6′* и *12′*, спаи которых были прижаты пружинами к

внутренней поверхности стенки. Оказалось, что стенки в точке *6′* нагреваются до температуры 130° С на 3 мин позднее, чем в точке *6*, а до 135° С — позднее на 6 мин. Температура в патрубке нижнего спуска (точки *12* и *12′*) практически была одинаковой на стадиях нагревания и выдержки аппарата при условии, что в патрубке отсутствовал конденсат. Таким образом, точки *6′* и *12′* при подачи пара в нижнюю часть аппарата представлены на рис. 10. существующих режимах стерилизации не являются «слабыми».

Некоторые полученные экспериментальные данные для варианта. Они свидетельствуют об изменении температуры в штуцере нижнего спуска (кривая *7*), в штуцере для установки манометра (кривая *10*) и штуцере с кольцевым зазором (кривая *11*). Одновременно показано изменение температуры, фиксируемой по термометру сопротивления (*ТСП*), и давления в полости аппарата (*Р*) с момента начала прогрева. Эти данные свидетельствуют о неоднородности температурного поля, об отставании скорости прогрева штуцера для установки манометра от других точек. Поэтому при оценке стерилизующего эффекта стадии нагревания аппарата до 130°С, продолжающейся 80 мин (см. рис. 10), следует ориентироваться на точку *10* как на «слабую».

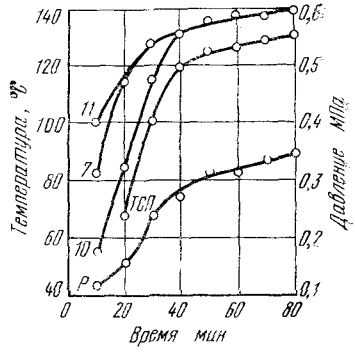


Рис. 10. Изменение давления и температуры в зависимости от продолжительности нагревания ферментатора вместимостью 63 м³:

7, 10, 11 — изменение температуры по показаниям термопар в точках *7, 10, 11* (см. рис. 9); *ТСП* — изменение температуры по показаниям термометра сопротивления; *Р* — изменение давления.

Важно отметить, что при недостаточно полном открывании вентиля на нижнем спуске в нижней части полости аппарата скапливается конденсат. В этом случае температура не только в патрубке нижнего спуска (точка *12*), но и в этой части полости (точка *7*) не превышает 110°С. При этом давление и температура в верхней части полости аппарата и показания термометра сопротивления свидетельствуют о достижении в аппарате необходимого режима стерилизации. Изменения температуры и давления в зависимости от продолжительности нагревания аппарата в точках *7* и *12* при недостаточно полно открытом вентиле удаления конденсата представлены на рис. 11, *а*. Температура в патрубке нижнего спуска (точка *12*) и в нижней части аппарата (точка *7*) не достигает значений, обеспечивающих гарантированную стерилизацию внутренней полости даже при нагревании в течение 80 мин.

Таким образом, в аппарате вместимостью 63 м³ в определенных ситуациях наиболее «слабой» точкой может быть нижняя часть полости аппарата и линия нижнего спуска при недостаточной скорости удаления «грязного» конденсата, которым она заполняется. Температура этой полости не превышает 110° С. Даже при

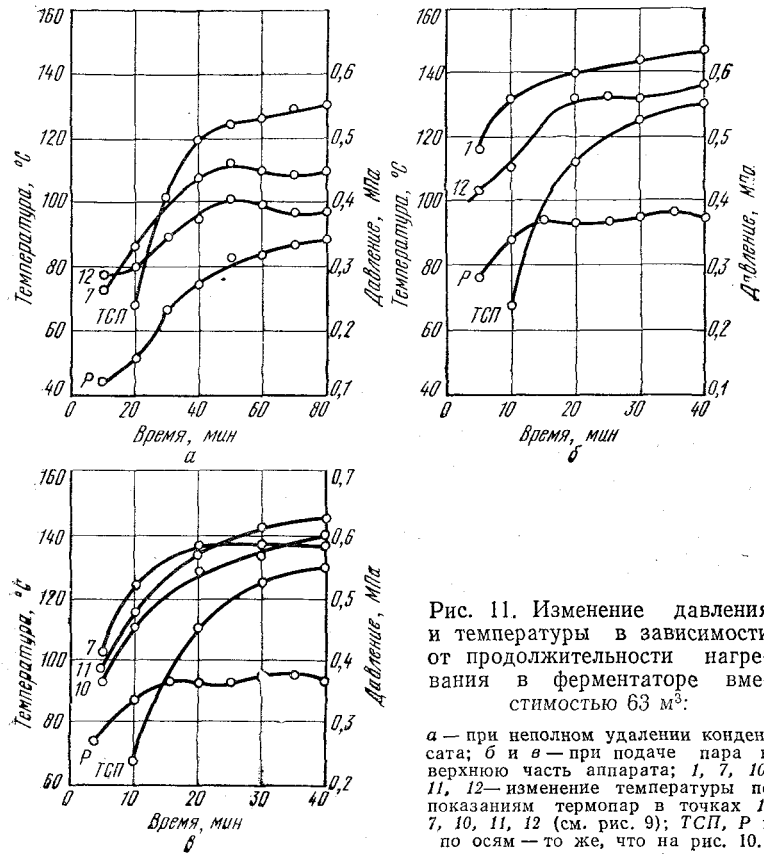


Рис. 11. Изменение давления и температуры в зависимости от продолжительности нагревания в ферментаторе вместимостью 63 м³:

а — при неполном удалении конденсата; *б* и *в* — при подаче пара в верхнюю часть аппарата; *1, 7, 10, 11, 12* — изменение температуры по показаниям термопар в точках *1, 7, 10, 11, 12* (см. рис. 9); *ТСП, Р* и по осям — то же, что на рис. 10.

достаточной скорости удаления конденсата температура 130° С достигается в нижнем спуске на 14 мин позднее, чем в остальной полости аппарата.

Более предпочтительным представляется вариант стерилизации аппарата с подачей пара сверху и удалением паровоздушной смеси и конденсата через нижний спуск. В этом случае (рис. 11, *а*) значительно сокращается (по сравнению с предыдущим вариантом) продолжительность достижения температуры стерилизации (не более 30 мин вместо 80 мин). Неоднородность температурного поля становится менее выраженной (рис. 11, *б*). Однако и в этом случае при несвоевременном удалении конденсата в нижнем спуске аппарата образуется область с пониженной температурой, уменьшающей эффективность стерилизации и приводящей к неоправданному увеличению продолжительности стерилизации.

Что касается стадии охлаждения аппарата, то при необходимо-

сти (если проведенные до этого стадии обеспечили стерильность) длительность ее можно сократить за счет продувки аппарата стерильным сжатым воздухом.

4.5. Пути повышения эффективности процессов стерилизации оборудования и коммуникаций

Оценивая существующие конструкции аппаратов и режимы их стерилизации с позиций обеспечения заданной степени стерильности, необходимо отметить некоторые наиболее принципиальные моменты.

Первым и наиболее эффективным шагом в повышении эффективности стерилизации оборудования и коммуникаций является ликвидация «слабых» точек, которые часто служат не только источником инфицирования, но и причиной необоснованно длительной стерилизации, приводящей к неоправданному расходу энергии. Способы устранения «слабых» точек часто зависят от конструктивных особенностей конкретного элемента и узла. Например, стерилизуемость тупиковых полостей малого диаметра может быть достигнута либо уменьшением длины полости (например, длины штуцера), либо принудительной подачей в нее пара. Наиболее общей является рекомендация по гарантированному обеспечению постоянного протока пара через каждую точку стерилизуемого объема с одновременным удалением образующегося конденсата.

Ликвидация «слабых» точек позволит на практике реализовать принцип равной эффективности стерилизации всех элементов и узлов, что в свою очередь послужит хорошей основой для внедрения в практику промышленной микробиологии расчетных методов количественной оценки результативности режимов стерилизации. Появится возможность сокращения длительности стерилизации промышленных аппаратов вплоть до исключения стадии выдержки, стерилизующий эффект которой фактически и учитывается большинством существующих регламентов в качестве единственного (хотя для указанных аппаратов он соизмерим с эффектом, достигаемым на стадиях нагревания — охлаждения в цикле стерилизации).

Что касается перспектив создания новых аппаратов, узлов и элементов, то они должны конструироваться с обязательным учетом требований достижения одинако-

вой стерилизуемости всех точек внутренних объемов при заданном сочетании температуры и времени. При этом нужно принимать во внимание и такую специфическую характеристику каждого элемента и узла, как удельную поверхность, имеющую важнейшее значение в практике при достижении требуемой температуры в каждой точке стерилизуемого объема. Пригодность создаваемых конструкций должна проверяться на специальных стендах, позволяющих имитировать условия стерилизации, характерные для микробиологических производств.

В заключение данного раздела следует рассказать и о проверенных на практике весьма эффективных режимах термической стерилизации с использованием предварительного вакуумирования [95] или многократного чередования давления и вакуума в аппарате [154]. В последнем случае стерилизацию осуществляют методом ВДВ (вакуум — давление — вакуум). Чередование циклов давление — вакуум способствует глубокому проникновению пара даже в мельчайшие поры, существенному повышению эффективности стерилизации при сокращении ее продолжительности. Предложена эмпирическая формула для расчета [154]

$$V_a = (P_0/P_1) - (P_п/P_2)^{n_д - 1}, \qquad (98)$$

где V_a — объем аппарата, в котором создается разрежение; P_0 — исходное давление в аппарате; P_1 — давление в аппарате после первого удаления пара; $P_п$ — давление в аппарате после введения пара; P_2 — то же после второго удаления пара; $n_д$ — число изменений давления в аппарате.

Следует подчеркнуть, что для практики, по-видимому, наиболее рационален путь, сочетающий, с одной стороны, совершенствование конструкций стерилизуемых элементов, узлов и аппаратов, а с другой — совершенствование режимов и способов стерилизации с учетом точек ввода пара и удаления конденсата, а также сочетания давление — разрежение во внутренних объемах стерилизуемых полостей.

5. ТЕРМИЧЕСКАЯ СТЕРИЛИЗАЦИЯ ЖИДКОСТЕЙ

5.1. Особенности термической стерилизации жидкостей

Эффективность термической стерилизации оборудования и коммуникаций, как отмечено в разделе 4, по существу, определяется одним показателем — степенью

инактивации контаминантов. Такая инактивация может обеспечиваться бесконечным числом сочетаний температура — время, выбранных в пределах, ограниченных, с одной стороны, приемлемой с точки зрения технологии длительностью процесса стерилизации, а с другой — техническими характеристиками оборудования и систем пароснабжения (допустимое рабочее давление, длительность подготовительных операций, давление пара в сети).

Значительно более сложными представляются процессы термической деконтаминации жидкостей, в которых гарантированная стерильность оборудования предполагается в качестве лишь первого, но необходимого этапа. Последующее решение задачи требует выбора-обоснования режимов стерилизации с обязательным учетом свойств жидкостей, подвергаемых воздействию повышенных температур, и возможного изменения физико-химических, биохимических, микробиологических и других характеристик этих жидкостей под влиянием температурно-временно́го фактора.

Проблема гарантированной стерильности жидкостей возникает уже на уровне лабораторий микробиологических производств при получении мелких серий питательных сред, необходимых для приготовления посевного материала, а также для проведения различных микробиологических анализов (оценка обсемененности целевых продуктов, воздуха, поверхностей оборудования и помещений, одежды работающего персонала и др.). Эта проблема усложняется при переходе к аппаратам, на которых должны воспроизводиться режимы, обеспечивающие успех на уровне лабораторий. Но если применительно к аппаратам периодического действия можно в какой-то мере использовать характеристики процесса автоклавирования, то в случае аппаратов непрерывного действия, по-видимому, нужны иные подходы.

Одной из главных особенностей проблемы получения стерильных жидкостей является сохранение после термического воздействия тех полезных свойств, которые необходимы для успешного осуществления технологических процессов [2, 4, 47, 52, 68]. Очевидно, что при стерилизации питательных сред необходимо обеспечить их биологическую полноценность для целевых

микроорганизмов, которая зависит в одних случаях от содержания какого-либо термолабильного компонента (например, витамина), в других — от появления ингибирующих веществ (например, продуктов разложения сахаров), а в третьих — от значения pH жидкости после стерилизации. По-видимому, следует учитывать, что отношение к повышенной температуре синтетических и так называемых природных питательных сред не будет одинаковым, а динамика изменения различных свойств будет существенно отличаться. Если в первом случае точно известен состав исходной питательной среды, то во втором, как правило, поддаются количественной оценке отдельные показатели (pH, содержание общего и аминного азота и др.), на основе которых нельзя дать исчерпывающей характеристики хотя бы химического состава среды (особенно после ее стерилизации).

Следует отметить и такую особенность: во многих инструкциях и регламентах не указаны характеристики питательных сред до и после стерилизации, а также допустимое их изменение, не влияющее на основные свойства. Это замечание в полной мере можно отнести и к многочисленным пеногасителям (кашалотовый жир, растительное масло, различные эмульсии полисилоксанов и др.), свойства которых меняются в весьма широком диапазоне. Определенная ясность появилась в отношении условий стерилизации водных растворов некоторых сахаров благодаря анализу и обобщению результатов комплекса работ, проведенных главным образом в сахарной промышленности. Эти исследования посвящены изучению кинетики распада сахаров под влиянием повышенной температуры и некоторых дополнительных факторов, например pH [47, 52].

К особенностям относится и различная обсемененность жидкостей посторонней микрофлорой, зависящая от свойств самих жидкостей. Например, меласса — хорошая среда для роста и развития многих микроорганизмов, поэтому концентрация контаминантов в ней может достигать $1 \cdot 10^6$ клеток на 1 мл [123]. В то же время концентрация контаминантов в растворах сахаров во многом зависит от концентрации последних. Известно, что сахара при содержании их в среде 0,5—2% (масса/объем) используются в качестве питательных

субстратов. При содержании 20—40% (масса/объем) эти же сахара угнетают рост микроорганизмов [46].

Жидкости, применяемые в технологии микробиологических производств, часто отличаются друг от друга не только по концентрации посторонней микрофлоры, но и по ее видовому составу. Так, отмечено [123], что наиболее важными для стерилизации питательных сред являются споры анаэробных бактерий типа C. sporogenes, аэробных бактерий рода Bacillus (B. subtilis, B. megatherium, B. mycoides, B. stearothermophilus). Вода рассматривается как источник анаэробных микроорганизмов [73]. Однако в зависимости от условий получения и предварительной обработки воды видовой состав и концентрация контаминантов могут меняться в широком диапазоне. Этот факт подтверждается и опытом работы многих микробиологических производств.

В сахарах содержатся следующие микроорганизмы [58, 67]: Bac. pelasites, Bac. subthermophilus, Bac. filaris, Bac. glutinosus, а также микроорганизмы вида Leuconostoc и лучистые грибы Actinomyces.

Весьма важен факт различной устойчивости одних и тех же микроорганизмов в разных жидкостях. Например, известно, что термическая устойчивость спор микроорганизмов в пеногасителях выше, чем в питательных средах [10]. Во многих случаях по-разному проявляется роль pH. Так, стерилизация водного раствора глюкозы при pH 3 способствует не только более быстрой, чем в нейтральной среде, инактивации посторонней микрофлоры, но и бóльшему сохранению сахара. В то же время для растворов сахарозы оптимальным для минимального разложения сахара является значение pH, равное 8,5 [47].

Некоторые особенности жидкостей по-разному проявляются при периодическом и непрерывном способах стерилизации. Это в первую очередь относится к размерам частиц, включающих конгломераты микроорганизмов, ПАВ и некоторые компоненты жидкости. Если при периодическом способе стерилизации эта особенность не имеет принципиального значения, то при непрерывном способе она предопределяет успех или неуспех процесса [141, 159]. Важно отметить и такие особенности, как вспениваемость стерилизуемых жидко-

Таблица 15. **Влияние термического воздействия на химические и физико-химические свойства раствора глюкозы [78]**

Показатель	Исходный раствор глюкозы	Раствор глюкозы, обработанный при	
		130 °С	160 °С
Редуцирующая способность в расчете на глюкозу, %	100	93,4	78,5
pH	6,2	5,3	4,0
Пенообразующая способность, мм	0	0	6
Пеностойкость, %	0	0	46
Интенсивность окраски, условные единицы	20	90	1330

стей и изменение их цветности. Представление об изменении некоторых свойств стерилизуемых растворов сахаров дает табл. 15. Весьма показательно, что после термической обработки при 160° С существенно изменяются пеностойкость и особенно цветность. Последняя, являясь весьма чувствительным тестом, свидетельствует о глубоких изменениях в растворе, не фиксируемых с помощью обычных характеристик.

Заметим, что при условиях, характерных для процессов термической стерилизации (130° С), pH меняется примерно на единицу. Этот факт необходимо учитывать на практике и корректировать значение pH с

Таблица 16. **Значение энергии активации в процессах инактивации микроорганизмов и разрушения химических веществ [106, 135, 164]**

Вещество	E, кДж/моль	Споры	E, кДж/моль
Фолиевая кислота	70,7	Bac. stearothermophilus штамм 1518	284,0
d-Пантотениловый спирт	88,2	Putrefactive anaerobe № СА 3679	318,0
Цианокобаламин	97,0	Cl. botulinum	344,0
Тиамингидрохлорид	109,0	Bac. stearothermophilus 7954	351,0
Уреаза	123,8	Bac. subtilis var. niger	294,0
Тростниковый сахар	92,0	Bac. mycoides	296,0
Аскорбиновая кислота	97,0	Bac. megatherium	207,0
		Cl. sporogenes	370,0

учетом требований регламентов. Наконец, отметим такую важнейшую особенность, как существенная разница в значениях энергии активации процессов инактивации микроорганизмов и разложения термолабильных компонентов стерилизуемых жидкостей (табл. 16). Во многих случаях такая разница служит основой для грамотного выбора способа (циклический или непрерывный) и режима стерилизации.

5.2. Анализ существующих способов и режимов стерилизации

Общая характеристика режимов и способов. Наиболее наглядно существующие способы и режимы стерилизации можно проиллюстрировать примерами, заимствованными из практики работы различных микробиологических производств. Данные табл. 17 свидетельствуют о том, что в настоящее время в промышленности микробиологического синтеза широко распространены два способа стерилизации: периодический и непрерывный, или поточный. Первый характерен для всех процессов автоклавирования и емкостных аппаратов периодического действия. Второй способ нашел практическую реализацию в УНС, широко распространенных на заводах пищевой, микробиологической и медицинской промышленности.

Что касается режимов стерилизации, то первое, что обращает на себя внимание, — это исключительное разнообразие температур и продолжительности их воздействия. Непостоянно и значение pH для различных жидкостей. Это многообразие режимов в первую очередь объясняется различными свойствами стерилизуемых жидкостей и их последующим назначением, а в некоторой степени и отсутствием глубокого научного обоснования режимов стерилизации с учетом кинетики процессов инактивации посторонней микрофлоры и изменения свойств жидкостей при воздействии повышенной температуры. Именно поэтому одна из главных задач, которая должна решаться совместными усилиями биотехнологов, микробиологов и биохимиков, заключается в обеспечении стандартности состава стерильных жидкостей в условиях лабораторий и производств.

Таблица 17. **Примеры режимов термической стерилизации различных жидкостей в технологии микробиологических производств**

Среда	Способ и режим стерилизации	Ссылка на литературный источник
Питательная на основе бульона из казеинового гидролизата; то же, но с добавкой 40% дрожжевого автолизата	Периодический: 120 °С, 15 мин; 115 °С, 30 мин; 110 °С, 30 мин; 105 °С, 60 мин; 100 °С, 60 мин Все режимы обеспечивают стерильность сред, не влияют на содержание аминного азота в них, а также на конечный урожай выращиваемых бактерий Флекснера	[2]
Физиологический раствор	Периодический 120 °С, 60 мин	[4]
Смесь глюкозы, фосфата и пептона	Периодический 122 °С, 15 мин; pH 7,2 Стерильная жидкость приобретает ингибирующие свойства	[134]
То же	То же, но pH 5,4 Стерильная жидкость не приобретает ингибирующих свойств	
Пеногаситель (тип и состав не указан)	Периодический: 120—126 °С, 4 ч; 126—130 °С, 2ч	[10]
Питательная (соевая мука, хлорид натрия, глюкоза, агар-агар, вода)	Периодический: 115 °С, 30 мин; pH 6,9—7,1	[68]
Питательная № 6 ВНИИА (кукурузный экстракт, сульфат аммония, хлорид натрия, мел, агар-агар, водопроводная вода)	Периодический: 115°С, 30 мин; pH 7,0—7,2	[68]
Питательная при производстве антибиотиков (состав не указан)	Периодический: 120—124 °С, 1 ч	[10]
Питательная, содержащая мелассы и используемая в ацетонобутиловом производстве	Периодический: 120°С, 13 мин; 115 °С, 15 мин	[91]
Питательная, содержащая глюкозу и соли	Непрерывный: 145 °С, 0,5—2 мин	[159]
Питательная для получения рибофлавина	Непрерывный: 133 °С, 4 мин; pH 4,5	[141]
Питательная для получения витамина B_{12}	Непрерывный: 161 °С, 13 мин; pH 4,5	[141]
Питательная для получения бутанола, ацетона, этанола	Непрерывный: 133 °С, 3 мин; pH 6,5	[141]
Питательная для получения глюконата натрия	Непрерывный: 133 °С, 5 мин; pH 4,5	[141]

Продолжение табл. 17

Среда	Способ и режим стерилизации	Ссылка на литературный источник
Питательная для получения итаконовой кислоты	Непрерывный: 147 °С. 5 мин; pH 6,1	[141]
Питательная для получения грибной амилазы	Непрерывный: 161 °С, 13 мин; pH 5,0	[141]

При исследованиях на лабораторном уровне, связанных с количественной оценкой процессов ферментации (например, при отработке лабораторных регламентов), обеспечение постоянного состава стерильных питательных сред (и других жидкостей) является одним из необходимых условий получения объективных данных о процессах [55]. На этом этапе должны быть выявлены основные характеристики, определяющие биологическую и технологическую полноценность жидкостей. Например, для питательных сред необходимо определять pH до и после стерилизации, содержание общего и аминного азота, сахаров, термолабильных компонентов (витамины, некоторые аминокислоты) и др. При этом желательно определение констант скорости убыли каждого компонента в зависимости от температуры и pH, а также изменения общего числа компонентов в зависимости от режимов стерилизации (сочетание температуры и продолжительности ее воздействия). Таким образом, уже на лабораторном уровне могут решаться важные технологические вопросы.

Переход к полупромышленному и промышленному производству должен осуществляться только на основе количественных характеристик процесса стерилизации, полученных в лабораториях. Однако при этом нужно учитывать и такие факторы, как изменение масштабов, в которых осуществляется процесс. Например, переход от колбы с 10 мл питательной среды к ферментатору, содержащему 10 м^3 такой же среды, связан с изменением масштаба в 10^6 раз. При исходной обсемененности питательной среды $1 \cdot 10^6$ спор на 1 мл в первом случае потребуется инактивация $5 \cdot 10^7$, а во втором —

$5 \cdot 10^{13}$ спор. При этом в обоих случаях желательно не только достижение требуемой эффективности стерилизации, но и сохранение на одинаковом уровне качества питательной среды, в том числе и ее ростовых свойств. В полном объеме такую задачу можно решить только применительно к жидкостям, имеющим стандартный состав до стерилизации. К их числу относятся некоторые так называемые синтетические питательные среды [134, 146], физиологический раствор, а также водные растворы сахаров и аминокислот. В качестве примера в табл. 18 приведен состав синтетической питательной среды.

Таблица 18. **Состав синтетической (солевой) питательной среды** [134]

Компонент	Содержание, г	Компонент	Содержание, г
Источник углерода	2,0	$MgCl_2$	0,095
Буфер (0,1 М)	12,1	KH_2PO_4	0,087
NaCl	5,4	Na_2SO_4	0,023
KCl	3,0	$FeCl_3$	0,00016
NH_4Cl	1,1	Дистиллированная вода	1000
$CaCl_2$	0,011		

Очевидно, что при переходе к стерилизации жидкостей нестандартного состава (питательных сред на основе природного сырья) может решаться, как правило, лишь задача стандартности воздействия технологических факторов (температура, pH, продолжительность) независимо от масштаба (пробирка, колба, ферментатор) или способа (циклический, непрерывный) стерилизации. В этом случае должна обеспечиваться только условная стандартность питательных сред, т. е. по обоснованному на данный период набору тестов, в том числе и кинетическим параметрам роста целевых микроорганизмов [140].

Важно отметить, что применительно к действующему микробиологическому предприятию решение о выборе тех или иных методов и режимов стерилизации, ранее обоснованных экспериментально, должно приниматься с учетом конкретных технических особенностей данного производства (наличие оборудования, параметры греющего пара и др.), а также экономических фак-

торов. При этом необходимо знать характеристики стерилизуемых жидкостей (физико-химические показатели, обсемененность посторонней микрофлорой, наличие ростовых факторов); режимы, отработанные в лаборатории, и гарантируемую при этом эффективность инактивации контаминантов; особенности, влияющие на перенос указанных режимов в условия промышленного производства (характеристики аппаратов, отличие в масштабах, изменения в обсемененности жидкостей, требуемая эффективность стерилизации, время, отводимое на стадию стерилизации в общем технологическом процессе, и др.).

Периодический способ стерилизации жидкостей, температурно-временные режимы. В специальной литературе уже неоднократно высказывалось и подтверждалось мнение о том, что для расчета эффективности режимов стерилизации необходимо знание температурно-временны́х режимов [98, 106, 107]. При этом отмечается зависимость режимов от методов нагревания и охлаждения. На рис. 12 показаны примеры этих методов. Так, варианты *а* и *б* характеризуют режимы с постоянной скоростью теплового потока. В первом случае обеспечивается постоянная скорость увеличения массы стерилизуемой жидкости за счет конденсирующегося пара, а во втором масса этой жидкости остается постоянной. Для вариантов *в* и *г* характерна изменяющаяся скорость теплового потока с изотермическим (*в*) и неизотермическим (*г*) источниками тепла. Типичные температурно-временны́е профили показаны на рис. 13.

Для описания любого из указанных температурно-временных режимов можно использовать следующие уравнения [107].

При нагревании острым паром (гиперболическая зависимость):

$$T = T_0 [1 + m\tau/(1 + r\tau)], \qquad (99)$$

где T — текущая температура жидкости в момент времени τ; T_0 — начальная температура жидкости;

$$m = \frac{i_0 S_п}{M_ж C_ж T_0}; \quad r = \frac{S_п}{M_ж},$$

где i_0 — энтальпия пара; $S_п$ — расход пара; $M_ж$ — исходная масса стерилизуемой жидкости; $C_ж$ — удельная теплоемкость жидкости.

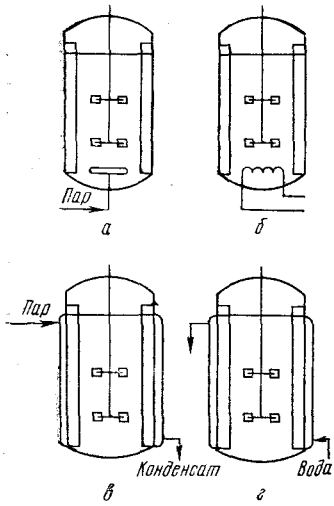


Рис. 12. Методы нагревания и охлаждения при периодической стерилизации жидкостей:

а — нагревание острым паром; *б* — электрический нагрев, *в* — нагревание глухим паром; *г* — охлаждение водой.

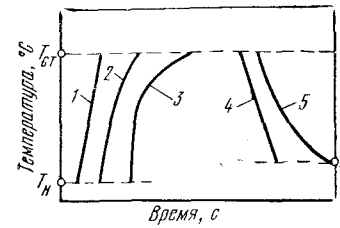


Рис. 13. Температурно-временные профили для стадий нагревания и охлаждения при стерилизации жидкостей:

1 — линейная зависимость на стадии нагревания жидкости от ее начальной температуры ($T_н$) до максимальной температуры процесса стерилизации ($T_{ст}$); *2, 3* — экспоненциальная и гиперболическая зависимости соответственно для тех же условий; *4* — линейная зависимость при охлаждении жидкости от $T_{ст}$ до $T_к$ (конечная температура); *5* — экспоненциальная зависимость для тех же условий.

При электрическом нагреве (линейная зависимость):

$$T = T_0 \left(1 + \frac{q}{M_ж C_ж T_0} \tau\right), \qquad (100)$$

где q — скорость теплопередачи.

При нагревании глухим насыщенным паром (экспоненциальная зависимость):

$$T = T_н \left\{1 + \frac{T_0 - T_н}{T_н} \exp\left[-\left(\frac{K_т F_т}{M_ж C_ж}\right)\tau\right]\right\}, \qquad (101)$$

где $T_н$ — температура теплоносителя; $K_т$ — коэффициент теплопередачи; $F_т$ — поверхность теплообмена.

Для случая охлаждения (экспоненциальная зависимость):

$$T = T_х \left\{1 + \frac{T_0 - T_х}{T_х} \exp\left\{-\left(\frac{wC'}{M_ж C_ж}\right) \times\right.\right.$$

$$\times\left[1-\exp\left(\frac{K_{\text{т}}F_{\text{т}}}{wC'}\right)\right]\tau\Big\}\Big\|, \qquad (102)$$

где $T_{\text{х}}$ — температура хладагента; w — расход хладагента; C' — удельная теплоемкость хладагента.

Уравнения (99) — (102) используют при вычислении значений критерия стерилизации, достигаемых на стадиях нагревания и охлаждения.

Предложены уравнения для расчета критерия стерилизации [107]. Примеры их для стадии нагревания приведены ниже.

Гиперболическая зависимость:

$$\nabla_{\text{н}}=\frac{A\delta m}{pr}\exp\left(-\frac{\delta r}{p}\right)\left[E_2\left\{\delta\left(\frac{1+r\tau_1}{1+p\tau_1}\right)-\right.\right.$$
$$\left.\left.-\frac{\delta r}{p}\right\}-E_2\left(\delta-\frac{\delta r}{p}\right)\right], \qquad (103)$$

где A — эмпирическая константа из уравнения Аррениуса $k=A\exp(-E/RT)$; $\delta=E/RT$; $p=\dfrac{i_0S_{\text{п}}}{M_{\text{ж}}C_{\text{ж}}T_0}+\dfrac{S_{\text{п}}}{M_{\text{ж}}}=m+r$;

$$E_{1,2}(Z)=\int_z^{\infty}\frac{\exp(-x)}{x^n}\,dx$$—(интегральная экспоненциальная функция). (104)

τ_1—продолжительность периода нагревания.

Линейная зависимость:

$$\nabla_{\text{н}}=\frac{A\delta}{m}\left[E_2\left(\frac{\delta}{1+m\tau_1}\right)-E_2\delta\right]. \qquad (105)$$

Экспоненциальная зависимость:

$$\nabla_{\text{н}}=\frac{A}{m}\exp(-\delta)\left\{E_1\left(\frac{\delta}{1+\dfrac{T_0-T_{\text{н}}}{T_{\text{н}}}}-\delta\right)-\right.$$
$$\left.-E_1\left[\frac{\delta}{1+\dfrac{T_0-T_{\text{н}}}{T_{\text{н}}}\exp(-m\tau)}-\delta\right]\right\}. \qquad (106)$$

Зависимость, аналогичную уравнению (106), можно использовать и для расчета $\nabla_{\text{охл}}$.

Порядок применения некоторых из приведенных уравнений рассмотрен на примерах в работе [96].

В расчетах для определения эффективности режимов при периодическом способе стерилизации знание скорости нагревания и охлаждения совершенно обязательно, поскольку эти величины характеризуют продолжительность пребывания жидкости в тепловом поле. Остановимся на некоторых расчетных уравнениях, позволяющих оценивать необходимые характеристики рассматриваемого способа стерилизации.

На основе анализа уравнения теплового баланса рекомендуется [31] определять изменение температуры нагреваемой жидкости из соотношения

$$t = \left(t_0 - \frac{i_0}{C_{\text{ж}}}\right) \exp\left(-\frac{S_{\text{п}} C_{\text{ж}}}{V_1 \rho_1 C_{\text{ж}} + M_{\text{к}} C_{\text{к}}} \tau\right) + \frac{i_0}{C_{\text{ж}}}, \quad (107)$$

где t — температура жидкости в момент времени τ; t_0 — то же, но до подачи пара ($\tau = 0$); $C_{\text{ж}}$ — теплоемкость жидкости; $S_{\text{п}}$ — расход пара; V_1 — объем жидкости в аппарате; ρ_1 — плотность жидкости; $M_{\text{к}}$ — масса нагреваемых частей корпуса аппарата; $C_{\text{к}}$ — теплоемкость материала аппарата; τ — продолжительность подачи пара.

Продолжительность нагревания жидкости до температуры стерилизации следует рассчитывать по уравнению [31].

$$\tau = \frac{V_1 \rho_1 C_{\text{ж}} + M_{\text{к}} C_{\text{к}}}{S_{\text{п}} C_{\text{ж}}} \ln \frac{t_0 C_{\text{ж}} - i_0}{t_{\text{к}} C_{\text{ж}} - i_0}, \quad (108)$$

где $t_{\text{к}}$ — максимальная температура, до которой нагревается жидкость.

В некоторых микробиологических производствах достаточно широко применяется вариант периодического способа стерилизации жидкостей, при котором пар подают не в жидкость, а в рубашку аппарата. При таком варианте нагревания не происходит разведение стерилизуемой жидкости конденсатом, количество которого может существенно зависеть от параметров греющего пара. Время достижения требуемой температуры в этом случае можно рассчитать из уравнения [14]

$$\tau = \frac{M_{\text{ж}} C_{\text{ж}}}{K_{\text{т}} F_{\text{т}}} \ln \frac{t_S - t_0}{t_S - t_{\text{к}}}, \quad (109)$$

где $M_{\text{ж}}$ — количество нагреваемой жидкости; $K_{\text{т}}$ — коэффициент теплопередачи; t_S — температура теплоносителя (пара); t_0 — начальная температура жидкости ($\tau = 0$); $t_{\text{к}}$ — конечная температура жидкости после нагревания.

Рекомендуется и расчетная формула для определения продолжительности охлаждения с помощью погружных змеевиков, смонтированных во внутренней полости аппарата [14]:

$$\tau = \frac{M_{ж} C_{ж}}{\varepsilon_{т} w_{т}} \ln \frac{t_0 - t'_{т}}{t - t'_{т}}, \qquad (110)$$

где $\varepsilon_{т}$ — эффективность теплообменника, определяемая из соотношения

$$\varepsilon_{т} = 1 - \exp\left(\frac{K_{т} F_{т}}{w_{т}}\right), \qquad (111)$$

где $w_{т}$ — водяной эквивалент теплоносителя; $t'_{т}$ — температура теплоносителя при $F_{т}=0$; t — температура охлаждаемой жидкости в момент времени τ.

Все расчеты по проведенным уравнениям могут быть значительно упрощены при использовании номограмм или ЭВМ в соответствии с рекомендациями, приведенными в работе [14].

В плане осуществления процессов деконтаминации важно отметить существенные отличия в продолжительности нагревания и охлаждения стерилизуемых жидкостей в аппаратах различной вместимости. С увеличением вместимости аппарата уменьшается площадь поверхности теплообмена на единицу объема жидкости. При этом уменьшается и значение коэффициента теплопередачи. Часто при увеличении вместимости аппарата приходится увеличивать и количество пара, подаваемого на единицу объема стерилизуемой жидкости. Указанные отличия приводят к тому, что при заданной температуре время достижения одинаковой эффективности стерилизации жидкости для геометрически подобных аппаратов разной вместимости меняется. Это хорошо иллюстрируется данными, приведенными в табл. 19.

Какие же моменты наиболее принципиальны для периодического способа стерилизации? Во-первых, нестационарный температурный режим, предполагающий существование стадий нагревания, выдержки и охлаждения. Во-вторых, доля стадий, характеризующихся переменной температурой стерилизуемой жидкости, возрастает по мере увеличения вместимости аппарата, в котором осуществляется процесс термической стерилизации. В-третьих, расчет эффективности процесса в це-

Таблица 19. **Время, необходимое для достижения одинаковой степени стерильности питательной среды в ферментаторах разной вместимости [106]**

Вместимость ферментатора, м³	Время нагревания до $t>103$ °С, мин	$\nabla^*_н$	Время выдержки при 120 °С, мин	$\nabla^*_в$	$\Sigma\nabla^*$
0,19	28,0	12,4	17,5	26,2	38,6
0,57	33,7	15,0	12,6	18,9	33,9
5,70	41,3	18,3	11,3	17,0	35,3
57,00	51,5	22,8	8,8	13,2	36,0

* Значения ∇ рассчитаны нами по данным, приведенным в работе [106].

лом и отдельных стадий должен базироваться на количественных характеристиках, предполагающих знание констант термической устойчивости микроорганизмов и скорости изменения питательных или иных полезных свойств стерилизуемых жидкостей.

Отметим, что в некоторых случаях, например при стерилизации так называемых гидролизных питательных сред, не содержащих термолабильных компонентов, периодический способ более предпочтителен, поскольку обеспечивает продолжительное воздействие (до десятков минут) теплового поля на среду. К недостаткам этого способа в первую очередь относится нестандартность воздействия температурно-временно́го фактора, особенно при изменении масштабов аппаратов-стерилизаторов, а значит, и нестандартность состава стерильных жидкостей. Это объясняется тем, что при характеристике режимов стерилизации учитывают, как правило, стерилизующий эффект только стадии выдержки при заданной температуре. Количественная характеристика интегрального теплового эффекта с помощью безразмерных комплексов по типу критерия стерилизации должна явиться основой грамотного переноса режимов, отработанных в лабораториях, на промышленные аппараты.

Непрерывный способ стерилизации жидкостей. Принципиальным преимуществом непрерывного способа стерилизации является возможность сохранения в стерильных жидкостях термолабильных компонентов (ви-

тамины, ферменты и др.). Это преимущество вытекает из различия в энергии активации процессов инактивации спор микроорганизмов и разрушения термолабильных веществ (см. табл. 16). Совместное рассмотрение кинетики этих процессов приводит к выражению [42]

$$\ln \frac{M_0}{M_\tau} = B' \exp\left(\frac{E - E_1}{RT}\right), \qquad (112)$$

где M_0 — количество термолабильного вещества в жидкости до стерилизации ($\tau=0$); M_τ — то же в момент времени τ; B' — величина, которая для условий стерилизации может быть принята постоянной; E — энергия активации процесса инактивации спор; E_1 — то же процесса разрушения термолабильного вещества.

Данные табл. 16 позволяют утверждать, что разность $E—E_1$ больше 1. При заданной эффективности стерилизации ($\nabla=\text{const}$) увеличение температуры (при соответствующем уменьшении экспозиции) приведет к снижению показателя степени при основании натуральных логарифмов, а значит, и правой части уравнения [112]. Таким образом, с повышением температуры стерилизации отношение M_0/M_τ уменьшается, приближаясь к единице, что свидетельствует о благоприятных условиях высокотемпературной кратковременной стерилизации жидкостей, содержащих термолабильные компоненты. Этот факт хорошо иллюстрируется рис. 14 [123].

Рассмотрим некоторые из результатов теоретического анализа термической стерилизации жидкости в системах непрерывного действия. В настоящее время в литературе описано много типов стерилизаторов непрерывного действия, применяемых в микробиологической, пищевой и медицинской промышленности. Как правило, такие системы состоят из трех основных блоков: нагревания, выдерживания, охлаждения. Эти системы отличаются по точности и стабильности поддержания температуры, просты в эксплуатации и надежны. Примеры температурно-временны́х зависимостей представлены на рис. 15.

Отмечают [108], что при практической реализации стадии нагревания оптимальные условия достигаются в том случае, когда пик температуры стерилизации совпадает с минимальным периодом экспозиции. В этом случае лучшими являются нагреватель с пароструйным

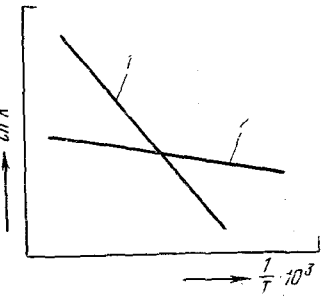


Рис. 14. Влияние температуры на удельную скорость инактивации спор (*1*) и константу скорости разрушения витаминов и ферментов (*2*).

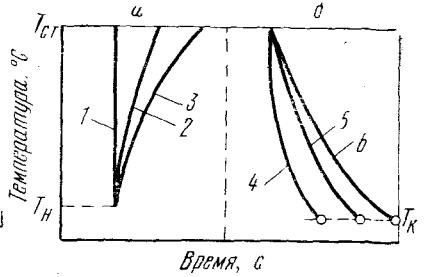


Рис. 15. Температурно-временные зависимости в различных секциях нагревания (*а*) и охлаждения (*б*):

а: 1 — паровой инжектор; *2* — пластинчатый теплообменник; *3* — теплообменник «труба в трубе» или спиральный; *б: 4* — пластинчатый теплообменник; *5* — погружной змеевик; *6* — теплообменник «труба в трубе». $T_к$, $T_н$ и $T_{ст}$ — то же, что на рис. 13.

инжектором и широко применяемые на практике нагревательные колонки с тангенциальным вводом пара и стерилизуемой жидкости. Следующим по эффективности нагревания является пластинчатый теплообменник, нагревающий жидкость быстрее, чем спиральный и трубчатый («труба в трубе») теплообменники, благодаря большей поверхности теплопередачи на единицу объема нагреваемой жидкости и более высокому коэффициенту теплопередачи.

Наиболее эффективно охлаждаются жидкости в пластинчатом теплообменнике. Однако по многим практическим соображениям довольно большое распространение на заводах получили теплообменники «труба в трубе». Примеры некоторых аналитических зависимостей, рекомендуемые в работе [108] для расчета значений критерия стерилизации в различных секциях нагревания и охлаждения, приведены ниже.

Для случаев нагревания с помощью изотермического источника тепла и охлаждения при постоянной теплоотдаче:

$$\nabla = \frac{A}{m_1}\left[\left[E_1\left(\frac{a}{1-b}\right) - E_1\left[\frac{a}{1-b\exp(-m_1\tau)}\right]\right]\right] - \frac{A\exp(-a)}{m_1}\left[\left[E_1\left(\frac{a}{1-b}-a\right) - E_1\left[\frac{a}{1-b\exp(-m_1\tau)}-a\right]\right]\right], \quad (113)$$

где $a = \frac{E}{RT}$; $b = \frac{T_0 - T_н}{T_н}$; $m_1 = \frac{K_т F_т}{\omega C}$.

Для случаев нагревания и охлаждения при противотоке, постоянной скорости потока и постоянной теплоемкости:

$$\nabla = \frac{Aa}{m_1}\left[E_2\left(\frac{a}{1+bm_1\tau}\right) - E_2(a)\right]. \qquad (114)$$

Выдержка при изотермических условиях:

$$\nabla = A\exp(-E/RT)\,\tau. \qquad (115)$$

Следует отметить, что уравнения (113) и (114) не учитывают неоднородность теплового поля в жидкости, а также распределение времени пребывания различных элементарных объемов жидкости при повышенной температуре. Именно поэтому в работах [96, 108] принимается постоянное значение удельной скорости гибели микроорганизмов по всей длине трубчатого выдерживателя, хотя из практики функционирования промышленных установок непрерывной стерилизации питательных сред известно, что температура среды на выходе из выдерживателя часто на 5—7° С ниже, чем на входе. Этот экспериментально установленный факт имеет исключительное значение для практики. Необходим учет снижения температуры при оценке интегрального теплового эффекта, получаемого жидкостью в системе.

В работе [129] приведены результаты теоретического анализа тепловой стерилизации питательной среды для условий, в которых учитывается варьирование температуры по длине трубчатого выдерживателя. Рассмотрим сущность этой работы. На рис. 16 приведена принципиальная схема установки непрерывной стерилизации питательной среды [129]. Нестерильная среда поступает в секцию нагревания и выдерживания, а затем через дросселирующий клапан — в секцию охлаждения. Предпринята попытка оценить распределение живых микробных

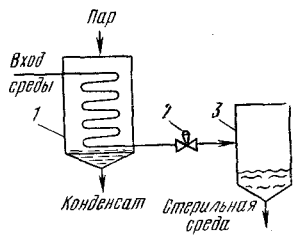


Рис. 16. Принципиальная схема установки непрерывной стерилизации питательной среды:

1 — секция нагревания и выдержки; *2* — дросселирующий клапан; *3* — секция охлаждения.

клеток в секции нагревания-выдерживания для получения информации, необходимой для описания работы стерилизатора. Для установившегося состояния на основе рассмотрения материального и энергетического баланса получены следующие дифференциальные уравнения для микробных клеток и температуры:

$$E_д \frac{d^2x}{dy^2} - v\frac{dx}{dy} + \langle R\rangle = 0, \tag{116}$$

$$E_д \frac{d^2T}{dy^2} - v\frac{dT}{dy} + \frac{2K_т}{\rho C_p r_0}(T_1 - T) = 0, \tag{117}$$

где $E_д$ — коэффициент дисперсии; x — концентрация живых микробных клеток; y — осевая координата; v — скорость потока; $\langle R\rangle$ — скорость реакции инактивации клеток; T — температура среды; $K_т$ — коэффициент теплопередачи; ρ — плотность среды; C_p — теплоемкость среды; r_0 — радиус трубы-выдерживателя; T_1 — температура конденсации пара.

Граничные условия для уравнений (116) и (117):
для $y=0$

$$E_д \frac{dx}{dy} = v(x - x_0), \tag{118}$$

$$E_д \frac{dx}{dy} = v(T - T_0); \tag{119}$$

для $y=L$

$$\frac{dx}{dy} = \frac{dT}{dy} = 0, \tag{120}$$

где x_0 — концентрация микробных клеток в питательной среде до стерилизации (на входе в выдерживатель); T_0 — температура среды на входе в выдерживатель.

$$\langle R\rangle = -kx, \tag{121}$$

где k — удельная скорость гибели клеток, подчиняющаяся уравнению Аррениуса.

После некоторых преобразований получают следующие уравнения:

$$\frac{1}{\mathrm{Pe}} \cdot \frac{d^2C}{dY^2} - \frac{dC}{dY} - K_0 C \exp\left(-\frac{\beta\theta}{1-\theta}\right) = 0, \tag{122}$$

$$\frac{1}{\mathrm{Pe}} \cdot \frac{d^2\theta}{dY^2} - \frac{d\theta}{dY} - B\theta = 0, \tag{123}$$

где $C = \frac{x}{x_0}$; $\theta = \frac{T_1 - T}{T_1}$; $\beta = \frac{E}{RT_1}$;

$$B = \frac{2K_T L}{\rho C_p v r_0}; \quad K_0 = \frac{A_0 L}{v}; \quad \mathrm{Pe} = \frac{vL}{E_д}; \quad Y = \frac{y}{L}.$$

При $Y = 0$

$$\frac{dC}{dY} = \mathrm{Pe}\,(C - 1), \tag{124}$$

$$\frac{d\theta}{dY} = \mathrm{Pe}\,(\theta + \alpha - 1). \tag{125}$$

При $Y = 1$

$$\frac{dC}{dY} = \frac{d\theta}{dY} = 0, \tag{126}$$

где $\alpha = T_0/T_1$.

Совместное решение уравнений (122) и (123) дает величину концентрации живых микробных клеток и величину различий температуры по длине трубчатого выдерживателя. Ситуация при очень малых и очень больших числах Пекле (Pe) является предельной и заслуживает особого внимания. При значениях Pe, стремящихся к бесконечности, можно пренебречь дифференциальными членами 2-го порядка в уравнениях (122) и (123). Тогда

$$\frac{dC}{dY} + K_0 C \exp\left(-\frac{\beta\theta}{1-\theta}\right) = 0, \tag{127}$$

$$\frac{d\theta}{dY} + B\theta = 0. \tag{128}$$

Подстановка для $Y=0$ дает $C=1$, $\theta=1-\alpha$.

В рассмотренных условиях трубчатый выдерживатель работает в режиме поршневого течения. Этот вариант является наилучшим для практики, поскольку гарантирует одинаковый тепловой эффект для всех микробных частиц, проходящих через трубчатый выдерживатель.

Во всех случаях, когда число Pe бесконечно мало, выдерживатель работает в условиях полного смешения. Для этой ситуации получены уравнения:

$$1 - C\left[1 + K_0 \exp\left(-\frac{\beta\theta}{1-\theta}\right)\right] = 0, \tag{129}$$

$$1 - \alpha - (1 + B)\,\theta = 0. \tag{130}$$

Аналитическое решение для изменения температуры по длине трубчатого выдерживателя дается выражением

$$\theta = \frac{m_1 \mathrm{Pe}\,(1-\alpha)\exp(m_1 + m_2 Y) - m_2 \mathrm{Pe}\,(1-\alpha)\exp(m_2 + m_1 Y)}{m_1 (m_2 + \mathrm{Pe})\exp(m_1) - m_2 (m_1 + \mathrm{Pe})\exp(m_2)}, \quad (131)$$

где
$$m_1,\ m_2 = \frac{\mathrm{Pe} \pm \sqrt{\mathrm{Pe}^2 + 4\mathrm{Pe}B}}{2}. \quad (132)$$

Практическое приложение результатов теоретического анализа рассматривается на примере трубчатого выдерживателя длиной 20 м и диаметром 20 см [129], скорость подачи питательной среды 10 м/ч. Значение коэффициента теплопередачи между стенкой и средой варьирует в диапазоне 58—581 Вт/(м²·°С). Инактивируются микроорганизмы, для которых $E=352{,}8$ кДж/моль. Для расчетов избраны следующие диапазоны изменения используемых величин: $1{,}0<B<10$; $0<\mathrm{Pe}<\infty$; $\alpha=0{,}7$; $T=310$°К.

Влияние числа Пекле на величину концентрации микробных клеток и изменение температуры показаны в табл. 20. При $\mathrm{Pe}=0$ трубчатый выдерживатель рабо-

Таблица 20. **Влияние числа Пекле на величину концентрации живых микробных клеток на выходе трубчатого выдерживателя и величину разности температуры при $B=5{,}0$ и $K_0=500$ [129]**

Pe	$C(1)$	$\theta(1)$
0	$0{,}71882\cdot10^{-2}$	0,11667
5	$0{,}84346\cdot10^{-4}$	0,11522
25	$0{,}82464\cdot10^{-22}$	$0{,}13519\cdot10^{-1}$
50	$0{,}31023\cdot10^{-31}$	$0{,}85621\cdot10^{-2}$
∞	$0{,}16375\cdot10^{-61}$	$0{,}47166\cdot10^{-2}$

тает как реактор *полного* смешения, а концентрация микробных клеток одинакова по всей длине, т. е. стерилизация осуществляется неэффективно. При $\mathrm{Pe}=\infty$ обеспечивается наиболее высокая эффективность стерилизации. Очевидно, что реальные рабочие ситуации находятся в диапазоне $0<\mathrm{Pe}<\infty$.

Параметр теплопередачи B показывает относительную величину коэффициента теплопередачи и теплоемкости питательной среды. Высокие значения параметра указывают или на низкое термическое сопротивление стенки выдерживателя, или на низкую теплоемкость

среды. В том и другом случае температура среды быстро растет, стерилизующая эффективность увеличивается (табл. 21).

Таблица 21. **Влияние параметра теплопередачи на концентрацию живых микробных клеток в среде после выдерживателя и на разницу в температуре при K_0=500 и Pe=10**

B	C (1)	θ (1)
1	$0{,}79227 \cdot 10^{-1}$	0,14322
2,5	$0{,}27255 \cdot 10^{-5}$	$0{,}85876 \cdot 10^{-1}$
5,0	$0{,}50925 \cdot 10^{-11}$	$0{,}36016 \cdot 10^{-1}$
7,5	$0{,}50925 \cdot 10^{-11}$	$0{,}53904 \cdot 10^{-2}$
10,0	$0{,}57399 \cdot 10^{-18}$	$0{,}22465 \cdot 10^{-2}$

Из данных табл. 22 видно, что разность температур уменьшается относительно равномерно по сравнению с изменением концентрации живых микробов. При Pe=10 концентрация микроорганизмов снижается экспоненциально на участке $Y=0{,}4 \div 0{,}6$, а для Pe=25 — на участке $Y=0{,}2 \div 0{,}4$. Установлено, что концентрация клеток уменьшается по экспоненте в том случае, когда величина разности температуры приближается к 0,1. Это означает, что для взятого автором примера большинство микробных клеток разрушается при температуре, превышающей 116° С.

Таблица 22. **Изменение концентрации живых микробных клеток и разности температур вдоль оси трубчатого выдерживателя при K_0=500 и B=5**

Y	Pe=10		Pe=25	
	C	θ	C	θ
0	0,96142	0,36180	0,98976	0,47320
0,1	0,89519	0,32816	0,89302	0,23605
0,2	0,72336	0,22757	0,48212	0,15401
0,3	0,40120	0,15782	$0{,}75641 \cdot 10^{-1}$	0,10048
0,4	0,11126	0,10946	$0{,}22228 \cdot 10^{-2}$	$0{,}65556 \cdot 10^{-1}$
0,5	$0{,}12496 \cdot 10^{-1}$	$0{,}75902 \cdot 10^{-1}$	$0{,}12585 \cdot 10^{-4}$	$0{,}42770 \cdot 10^{-1}$
0,6	$0{,}55202 \cdot 10^{-3}$	$0{,}52649 \cdot 10^{-1}$	$0{,}18324 \cdot 10^{-7}$	$0{,}27305 \cdot 10^{-1}$
0,7	$0{,}10599 \cdot 10^{-4}$	$0{,}36556 \cdot 10^{-1}$	$0{,}96666 \cdot 10^{-11}$	$0{,}18206 \cdot 10^{-1}$
0,8	$0{,}10355 \cdot 10^{-6}$	$0{,}25526 \cdot 10^{-1}$	$0{,}24873 \cdot 10^{-14}$	$0{,}11880 \cdot 10^{-1}$
0,9	$0{,}61441 \cdot 10^{-9}$	$0{,}18387 \cdot 10^{-1}$	$0{,}39215 \cdot 10^{-18}$	$0{,}77891 \cdot 10^{-2}$
1,0	$0{,}50925 \cdot 10^{-11}$	$0{,}15436 \cdot 10^{-1}$	$0{,}82646 \cdot 10^{-22}$	$0{,}57938 \cdot 10^{-2}$

Приведенный пример в сочетании с теоретическим анализом позволил сделать заключение о том, что значения концентрации живых микроорганизмов и разность температур уменьшаются по мере увеличения числа Пекле [129]. Поэтому поршневой режим работы трубчатого выдерживателя с бесконечно малым коэффициентом дисперсии обеспечивает наибольшую эффективность стерилизации.

Весьма полезный методический подход к определению длины трубчатого выдерживателя и стерилизующей эффективности режимов в различных элементах УНС рассмотрен в работе [130]. На рис. 17 показаны

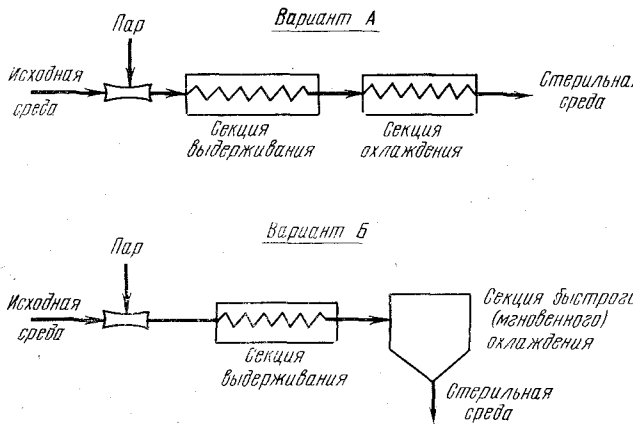


Рис. 17. Принципиальные схемы технических систем высокотемпературной кратковременной стерилизации жидкостей при инжекционном типе нагревателя.

принципиальные схемы УНС для варианта инжекционного нагрева питательной среды насыщенным водяным паром, а на рис. 18 — кривые «температура—время». Кривая *А* характеризует процесс при установке секции охлаждения непосредственно за секцией нагревания. Вследствие медленного процесса теплопередачи общее время стерилизации больше, чем в случаях, характеризующихся кривыми *Б* и *В*. В последних двух вариантах использован инжекционный метод нагревания среды, однако на стадии охлаждения в случае *Б* среда охлаж-

дается в теплообменнике, а в случае B — в быстродействующем испарителе (вариант $Б$ на рис. 17).

Показано, что для многих жидких питательных сред характерен неньютоновский режим течения, для которого напряжение сдвига подчиняется уравнению

$$\sigma_c = K_c \left(- \frac{dV}{dr} \right)^n, \quad (133)$$

где σ_c — напряжение сдвига; K_c — показатель консистенции; V — скорость; r — радиальная координата; n — показатель псевдопластичности.

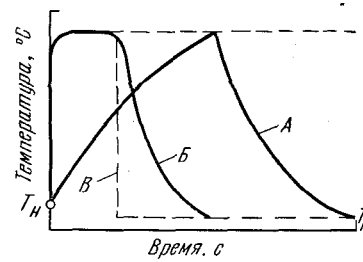


Рис. 18. Различные сочетания температуры и времени в процессе термической стерилизации жидкостей:
$T_н$ и $T_к$ — начальная и конечная температура соответственно.

В табл. 23 приведены значения K_c и n для некото-

Таблица 23. **Значения показателей консистенции и псевдопластичности пищевых жидкостей [130]**

Продукт	Температура, °С	n	K_c
Яблочное пюре	27,2	0,382	108,50
	50,6	0,301	77,00
Концентрированный апельсиновый сок	15,0	0,584	11,90
	0	0,542	18,00
Томатная паста	25,0	0,364	36,00
	47,8	0,391	28,20
Томатный сок			
5,8%	32,0	0,590	2,32
	50,0	0,540	2,70
	65,0	0,470	3,70
12,8%	32,0	0,430	20,00
	50,0	0,423	18,80
	65,0	0,350	22,00
	82,0	0,345	21,20
Абрикосовый сок (16% частиц твердого вещества)	30,0	0,300	68,00
	82,0	0,270	56,00
Персиковый сок (11,7% частиц твердого вещества)	30,0	0,280	72,00
	80,0	0,270	58,00
Грушевый сок (16% частиц твердого вещества)	30,0	0,350	56,00
	82,0	0,350	46,00

рых пищевых жидкостей. Определение этих характеристик для жидкостей, стерилизуемых в микробиологиче-

ской промышленности, представляет несомненный интерес.

Экспериментально показано, что изменение показателя консистенции в зависимости от температуры описывается уравнением Аррениуса

$$K_c = A \exp(-E/RT). \tag{134}$$

В трубчатом выдерживателе распределение микроорганизмов по скоростям приводит к изменению времени пребывания микроорганизмов при повышенной температуре. Для изотермических условий рекомендуют при расчете распределения по скоростям использовать уравнение [130]

$$\frac{V_л}{\langle V \rangle} = \frac{3n+1}{n+1}\left[1 - \left(\frac{r}{r_0}\right)^{\frac{n+1}{n}}\right], \tag{135}$$

где $V_л$ — локальная скорость; $\langle V \rangle$ — объемная скорость.

В секции охлаждения (A на рис. 17) ситуация более сложная вследствие варьирования температуры среды. Изменение температуры влияет на вязкость жидкости, последняя в свою очередь — на распределение по скоростям. Следовательно, для точного расчета времени пребывания микроорганизмов в секции охлаждения необходимо знать распределение температуры в осевом и радиальном направлениях. Энергетический баланс записывается в виде соотношения

$$C_p V \frac{\partial T}{\partial y} = K_t\left(\frac{\partial^2 T}{\partial r^2} + \frac{1}{r}\frac{\partial T}{\partial r}\right) \tag{136}$$

при условии, что

$$\left.\begin{aligned} y = 0;&\quad T = T_0 \\ r = 0;&\quad \frac{\partial T}{\partial r} = 0 \\ r = r_0;&\quad T = T_w, \end{aligned}\right\} \tag{137}$$

где K_t — удельная теплопроводность; T_w — температура стенки трубы (температура охлаждающей воды).

Полагают [130], что при определении длины трубчатого выдерживателя необходимо обеспечить выполнение двух требований: концентрация спор Cl. botulinum (применявшийся в опытах микроорганизм) на выходе выдерживателя должна быть снижена до 10^{-12}—10^{-14} от исходного уровня, а температура среды должна соот-

ветствовать температуре стерилизации 121° С (см. рис. 19, *а*). В случае *А* подбирают длину выдерживателя и охладителя, в случае *Б* — только длину выдерживателя, поскольку используют испаритель, обеспечивающий практически мгновенное охлаждение среды.

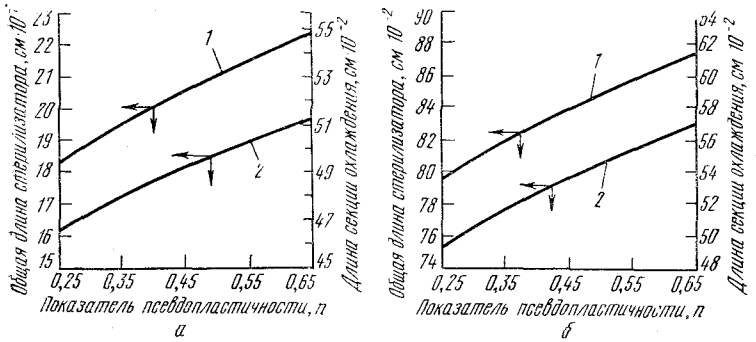


Рис. 19. Влияние показателя псевдопластичности на длину стерилизатора для случая *А*:

а — при 121° С; *б* — при 126° С; *1* — уменьшение количества жизнеспособных спор Cl. botulinum в 10^{14} раз; *2* — то же, но в 10^{12} раз.

В рассмотренном примере различие между общей длиной стерилизатора при различных требованиях к стерильности изменяется от 202 см при $n=0{,}25$ до 310 см при $n=0{,}65$. Требование степени стерильности не влияет на длину секции охлаждения, но последняя зависит от температуры на выходе стерилизатора. При скорости жидкости 10 м/с общее время стерилизации среды для рассматриваемой системы варьирует от 3,04 мин при $n=0{,}25$ до 3,74 мин при $n=0{,}65$. На рис. 19, *б* представлены аналогичные данные для случая *А* при температуре процесса 126° С, которая на 5° С выше рассмотренной ранее. Сравнение данных рис. 19, *а* с данными рис. 19, *б* показывает, что, хотя длина секции охлаждения увеличивается, общая длина стерилизатора значительно уменьшается при повышении температуры процесса. Эти данные подтверждают преимущества высокотемпературного кратковременного процесса стерилизации. В рассмотренном выше случае при $t=121°$ С концентрация спор Cl. botulinum в конце секции выдерживания понижается до $5\cdot10^{-11}$ от исходного

уровня обсемененности при общем значении $1 \cdot 10^{-12}$. Это указывает на незначительный вклад секции охлаждения в суммарный стерилизующий эффект.

Однако по мере увеличения температуры до 126° С концентрация микроорганизмов в конце секции выдерживания снижается до $1 \cdot 10^{-9}$ и влияние секции охлаждения на инактивацию спор Cl. botulinum увеличивается. В этом случае общее время стерилизации составляет 1,32 мин при $n=0{,}25$ и 1,44 мин при $n=0{,}65$. При этом разлагается 6% витамина B_{12} от исходного количества.

По данным рис. 20, *а*, *б* можно оценить влияние показателя псевдопластичности на стерилизаторе для

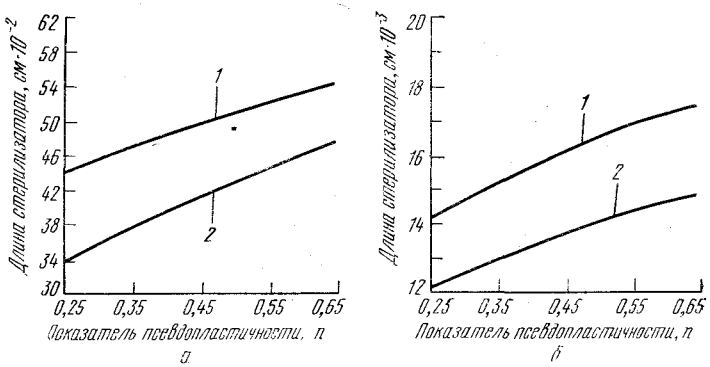


Рис. 20. Влияние показателя псевдопластичности на длину стерилизатора для случая *Б*:

а — при 121° С; *б* — при 126° С; *1* и *2* — то же, что на рис. 19.

случая *Б* при замене секции охлаждения быстродействующим испарителем или другим устройством мгновенного охлаждения для различных температур процесса и различных требований стерильности. Общий характер зависимости длины стерилизатора от показателя псевдопластичности (n) довольно сходен с таковым, показанным на рис. 19, *а*, *б*. Время стерилизации в данном случае значительно меньше, чем в предыдущем варианте. Для выбора окончательного варианта промышленной установки нужен всесторонний учет технологических, экономических и других факторов, характерных для процесса получения конкретного продукта. Однако при этом необходимо учитывать, что для процессов,

требующих так называемой абсолютной стерильности, в качестве выдерживателей следует применять теплообменники типа «труба в трубе». Такие теплообменники гарантируют исключение случайного проскока посторонней микрофлоры, весьма характерного для всех конструкций выдерживателей объемного типа.

Для оценки поведения ламинарного потока псевдопластической жидкости в трубе предложены и другие зависимости [133]:

$$V = \frac{2L}{P_p K_{пр}^{1/n}} \left[\frac{\left(\frac{P_p}{2L} R_w\right)^{\frac{1}{n+1}} - \left(\frac{P_p}{2L} R\right)^{\frac{1}{n+1}}}{\frac{1}{n+1}} \right], \quad (138)$$

$$V_{max} = \frac{2L}{P_p K_{пр}^{1/n}} \left[\frac{\left(\frac{P_p}{2L} R_w\right)^{\frac{1}{n+1}}}{\frac{1}{n+1}} \right], \quad (139)$$

$$\frac{V_{max}}{\overline{V}} = \frac{1/(n+3)}{1/(n+1)}, \quad (140)$$

где V — скорость жидкости в осевом направлении при радиусе R; L — длина трубчатого выдерживателя; P_p — перепад давления по длине трубчатого выдерживателя: R_w — радиус трубы; R — расстояние в радиальном направлении от оси трубы; $K_{пр}$ — коэффициент пропорциональности для жидкости; V_{max} — максимальная скорость жидкости при $R=0$; $\overline{V}$ — объемная средняя скорость жидкости.

Для оценки распределения частиц по времени пребывания рекомендуют соотношение

$$V = \overline{V} \frac{\frac{1}{(n+3)}}{\frac{1}{(n+1)}} \left[1 - \left(\frac{R}{R_w}\right)^{\frac{1}{n+1}} \right]. \quad (141)$$

Следует еще раз подчеркнуть, что многие подвергаемые термической стерилизации жидкости проявляют либо ньютоновские, либо псевдопластические (неньютоновские) реологические свойства. В этих случаях, как видно из уравнения (141), для вычисления скоростей течения необходимо получить значение n.

Псевдопластические жидкости характеризуются кажущейся вязкостью (отношение напряжения сдвига к

скорости сдвига), которая уменьшается с увеличением скорости сдвига; их свойства могут быть довольно хорошо описаны уравнением [133]

$$\mu_a = K_ж \gamma^{n-1}, \qquad (142)$$

где μ_a — кажущаяся вязкость жидкости; $K_ж$ — коэффициент пропорциональности жидкости, мера вязкости; γ — скорость сдвига.

Таким образом, зависимость $\lg \mu_a$ от $\lg \gamma$ (при данной температуре) — это прямая линия с углом наклона, определяемым величиной $n - 1$. Величина n — мера степени отклонения от ламинарного течения ньютоновской среды, должна находиться между 0 и 1 (для ньютоновской жидкости предельный случай $n=1$). На рис. 21 показаны кривые зависимости вязкости от скорости сдвига для типичной псевдопластической жидкости. Наклон этих кривых составляет 0,32, откуда $n=0{,}68$. Путем подстановки этой величины в уравнение (142) можно вычислить скорость любой линии потока в выдерживающей трубе.

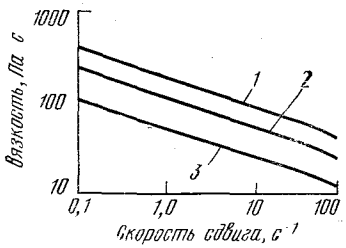


Рис. 21. Изменение кажущейся вязкости для псевдопластической неньютоновской жидкости в зависимости от скорости сдвига при температуре:
1 — 73,3° С; *2* — 128,9° С; *3* — 184,4° С.

Разработана программа [133] для цифровой вычислительной машины с целью определения вероятности выживаемости спор (или бактерий) при асептическом заполнении контейнера с пищевыми продуктами (содержащими дискретные частицы), подвергнутыми тепловой обработке в системе теплообменников с наклонной поверхностью и выдерживающей трубой. Эта программа основана на допущении равномерного распределения бактерий как в среде-носителе, так и веществах в виде частиц; исходная обсемененность выражена в виде концентрации на единицу объема каждого компонента. Полагают [133], что можно использовать и неравномерное распределение спор в частице, если таковое имеет место. Сделано также допущение, что температура в плоскости, перпендикулярной направлению потока через систему, постоянная.

Применение вычислительных машин для анализа процессов, протекающих в установках непрерывной стерилизации самых различных типов, позволит ближе подойти к решению задачи по нахождению действительно оптимальных режимов с учетом всех основных особенностей стерилизуемых жидкостей. В модели используются фактические (измеренные) температуры потока, т. е. можно избежать ошибок, возникающих при применении расчетных температур. Отмечается, что такой технологический параметр, как длина трубчатого выдерживателя для требуемой летальности, должен определяться методом итерации, поскольку программа может определять только ту летальность, которая получается для данных технологических условий. Продолжительность всех расчетов при использовании компьютера IBM 360-165 составляет в среднем 2 мин. Важно подчеркнуть, что теоретические расчеты в данном случае являются лишь первым (хотя и необходимым) этапом в создании эффективных УНС. Выбор и обоснование типа системы, ее состава, характеристик отдельных узлов и аппаратов должны обязательно дополнять результаты расчетов.

Итак, многообразие условий, в которых стерилизуют жидкости, определяется в основном двумя причинами: свойствами жидкостей и отсутствием завершенных теоретических разработок, которые позволяли бы на основе кинетики развития целевых микроорганизмов или накопления продуктов их жизнедеятельности сформулировать требования к режимам подготовки и обработки этих жидкостей. Последнее обстоятельство во многом обусловлено отсутствием требуемого объема экспериментальных данных по кинетике изменения полезных свойств жидкостей при стерилизации в сочетании с кинетикой отмирания посторонней микрофлоры. Накопление таких данных — одна из задач биотехнологии.

5.3. Методический подход к обоснованию оптимальных режимов стерилизации жидкостей

Методический подход к обоснованию оптимальных режимов стерилизации должен основываться на знании комплекса взаимосвязанных вопросов. Первым из них является обсемененность жидкости посторонней микро-

флорой, которая, как показал проведенный выше анализ литературы, может изменяться в достаточно широком диапазоне. Следующий вопрос касается требуемой степени стерильности, которая должна определяться на основе не только технологических, но и экономических показателей, учитывающих всю совокупность процессов получения данного продукта. По-видимому, в этом случае следует говорить о технико-экономическом обосновании целесообразности той или иной степени стерильности.

Совершенно необходимо экспериментально определять кинетические характеристики процесса инактивации микроорганизмов под действием повышенной температуры, а также одновременно протекающего процесса разложения термолабильных компонентов или ухудшения полезных свойств стерилизуемой жидкости. Значение констант термической устойчивости посторонней микрофлоры и интересующих производственников веществ позволит перейти к обоснованному выбору моделей, наиболее адекватно описывающих процесс стерилизации. Именно использование кинетических уравнений для оптимизации процессов получения стерильных жидкостей в сочетании с безразмерными комплексами представляется весьма перспективным по аналогии с решением задач по улучшению качества пищевых продуктов [121]. При этом важно подчеркнуть исключительную значимость вопроса обоснования критерия оптимизации. В наиболее простом случае это может быть количество биомассы, получаемой в единицу времени с единицы объема ферментатора. В более сложных случаях необходимо учитывать и такой сложный показатель, как качество полупродуктов и конечных продуктов, зависящее от многих параметров и показателей. В этом направлении еще не решены многие вопросы не только практического, но и методического характера.

Оценка влияния pH. Исключительно важным является обеспечение требуемого значения pH стерильной жидкости (H_f). Эта задача решена, например, путем доведения pH жидкости до определенного начального уровня (H_i) перед стерилизацией [104]. Метод был разработан на основе опытов применения комплексной ферментационной среды с антибиотиками (среда DCK). В этих опытах для определения влияния стерилизации

на pH среды перед автоклавированием (40 мин, 121°С) pH небольших проб доводили до различных значений. После определения величины H_f среды в каждой колбе находили изменение относительно H_i (Δ pH), строили график Δ pH—H_i, который в данном случае представлял собой прямую с наклоном 0,64. По величинам Δ pH, найденным по этому графику, можно предсказать любую величину H_f при данной величине H_i. Зависимость между H_i и H_f выражают следующим образом:

$$H_f = H_i - \Delta\text{pH}. \tag{143}$$

Для данного графического метода определения H_f приемлемо и следующее рабочее уравнение:

$$H_f = H_i - a\,(H_i - H_0), \tag{144}$$

где a — наклон прямой; H_0 — величина pH в точке пересечения графика с осью x.

При перегруппировке членов уравнения (145) получаем:

$$H_f = (1 - a)\,H_i + aH_0. \tag{145}$$

Величина констант a и H_0 изменяется в зависимости от вида использованной среды, а также от условий стерилизации. В данном случае для среды DCK: $a=0{,}64$; $H_0=5{,}80$.

Аналогичные опыты поставлены и с обычной лабораторной культуральной средой — питательным бульоном. Как и в опытах со средой DCK, график Δ pH—H_i представляет собой прямую линию. Зависимость между H_i и H_f можно выразить с помощью уравнения (145), но в данном случае $a=0{,}095$, а $H_0=6{,}35$.

Линейная зависимость между H_i и pH, установленная для питательного бульона и среды DCK, на некоторые среды, в частности на триптиказный соевый бульон, не распространяется. Для этого бульона получен график нелинейной зависимости Δ pH от H_i, при линеаризации которого в полулогарифмических координатах для температуры 121° С в течение 25 мин выведено уравнение

$$\Delta\text{pH} = 10^{aH_i+b} + C. \tag{146}$$

После перегруппировки уравнения (146)

$$\lg(\Delta\text{pH} - C) = aH_i + b, \tag{147}$$

где $a=0{,}11$; $b=-0{,}80$; C — константа, равная, по данным экспериментов, 1,04.

Зная величину H_i, по уравнению (147) или непосредственно по данным графиков можно найти (ΔpH—C). Затем для того, чтобы определить H_f, величину pH можно подставить в уравнение (143).

В целях проверки приемлемости уравнения (145) для среды DCK и питательного бульона, а уравнения (147) для триптиказного соевого бульона pH небольших порций каждой среды предварительно доводили до H_i в диапазоне 7,5—10,4 и автоклавировали, как указано выше. После стерилизации определенные величины H_f для каждой среды хорошо соответствовали расчетным величинам.

Метод [121] оказался надежным в плане прогнозирования величины pH для широкого диапазона сред. Первый этап работы — графическое определение влияния стерилизации на величину H_i. Для этого необходимо лишь 4—5 экспериментальных точек. При линейной зависимости между ΔpH и H_i величины как H_0, так и a можно найти по уравнению (145). Если график не является прямой, его можно линеаризовать, используя уравнение (147). Кроме прогнозирования величины H_f по величине H_i, уравнение (147) можно использовать для нахождения H_i (величина, до которой необходимо предварительно довести pH среды, с тем чтобы получить желаемую величину H_f). На практике это должно привести к устранению затрат времени и усилий, необходимых для регулирования pH среды после стерилизации.

Данный метод особенно удобен при работе с большими объемами сред, регулирование pH которых после стерилизации связано со значительными трудностями. Этот метод успешно применялся для обеспечения оптимальной величины pH среды DCK для синтеза антибиотиков [104]. Установлено, что он более быстрый, чем обычный метод проб и ошибок.

Кинетический подход к решению задач по оптимизации. В решении задач оптимизации режимов стерилизации жидкостей исключительно плодотворно направление, основанное на знании количественных характеристик процессов, влияющих на изменение тех или иных свойств жидкостей. Изучение кинетики этих процессов составляет одну из главных задач специалистов, занимающихся вопросами получения стерильных жид-

костей стандартного состава, а также стандартизацией условий обработки (в том числе и стерилизации) этих жидкостей. Информация, накопленная в этой области, еще невелика. Однако и имеющиеся сведения весьма показательны (особенно в методическом отношении) при разработке подходов к решению указанных выше задач. Так, получены данные об изменении константы скорости разложения некоторых сахаров в зависимости от температуры и pH, позволяющие составлять модели оптимизации. Например, модель для изотермических условий стерилизации следующая.

$$\left.\begin{array}{l} \text{а) } X_c = 100\left[1 - \exp\left(-k_c'\tau\right)\right]; \\ \text{б) } k_c = f(t,\ \text{pH}); \\ \text{в) } \nabla = k\tau; \\ \text{г) } k = A\exp\left(-E/RT\right) \end{array}\right\} \qquad (148)$$

при ограничениях:

$$0{,}01 < X_c < 0{,}1;$$
$$3 < \text{pH} < 9;$$
$$1{,}0\ \text{с} < \tau < 180\ \text{с};$$
$$100^\circ\text{C} < t < 150^\circ\text{C};$$
$$40 < \nabla < 100,$$

где X_c — количество сахара, разложившегося в результате термической стерилизации раствора (за 100% принимается исходное количество в растворе до стерилизации); k_c' — константа скорости разложения сахара.

Очевидно, что для условий стерилизации с переменной температурой уравнения, которые входят в состав модели, должны иметь более сложную структуру, отражающую динамику изменения температуры как во времени, так и по длине трубчатого выдерживателя.

При выборе ограничений возможны самые различные ситуации, часто диктуемые особенностями решаемой задачи. Например, на практике изменять pH удобно в более узком диапазоне, чем указано выше. Это замечание относится к времени и температуре обработки. В зависимости от требований может быть изменен и интервал варьирования критерия стерилизации.

Применительно к стерилизации растворов сахаров для решения практических задач очень важно знать зависимость константы скорости разрушения сахара от

температуры и pH. Такие зависимости в наиболее обобщенном виде представлены в работе [32], посвященной решению задач в сахарной промышленности. Однако полученные результаты, базирующиеся на итогах работ [23, 74, 75], можно использовать и для решения задач в промышленности микробиологического синтеза. Приведем некоторые примеры зависимостей для различных сахаров.

Глюкоза

$$k_c' = 10^{15{,}7-\frac{7219}{T}-0{,}72\,\mathrm{pH}} + 10^{25-\frac{10\,260}{T}-0{,}017T+0{,}77\mathrm{pH}} \qquad (149)$$

Фруктоза

$$k_c' = 10^{9{,}99-\frac{4850}{T}-0{,}54\mathrm{pH}} + 10^{22{,}33-\frac{8529}{T}-0{,}017\mathrm{pH}+0{,}54\mathrm{pH}} \qquad (150)$$

Сахароза

$$k_c' = 10^{16{,}8-\frac{5666}{T}-\mathrm{pH}} + 10^{20{,}17-\frac{9065}{T}-0{,}017T+0{,}57\mathrm{pH}} \qquad (151)$$

Зависимости, аналогичные (149) — (151), должны быть получены экспериментальным путем для аминокислот, витаминов и других веществ, разложение которых нежелательно при термической стерилизации жидкостей. Некоторые данные по кинетике разложения аминокислот в зависимости от pH приведены в работе [88].

Таким образом, одним из необходимых условий выбора действительно оптимальных условий стерилизации является знание температурно-временны́х зависимостей для установок периодического и непрерывного действия. Применительно к последним особенно важно знать распределение времени пребывания частиц в тепловом поле, а также влияние размера частиц на скорость их прогревания до заданной температуры.

Очевидно, что идеальным будет такой стерилизатор непрерывного действия, в котором обеспечен режим поршневого течения ($Pe=\infty$). Однако для практики характерны установки, характеризующиеся значениями $0<Pe<\infty$. Весьма полезен для практических расчетов график зависимости доли выживших микроорганизмов

N/N_0 от безразмерной скорости гибели микроорганизмов (N_r) при меняющихся значениях Pe (рис. 22) [96].

$$N_ч = kL/\overline{V}, \qquad (152)$$

где $\overline{V}$ — средняя скорость жидкости в трубе.

При оценке эффективности режима стерилизации в установке непрерывного действия следует учитывать распределение времени пребывания. Для случая отмирания микроорганизмов по экспоненте при изотермических условиях:

$$N = N_0 \exp(-k\tau) F(\tau). \qquad (153)$$

Для случая отмирания микроорганизмов по S-образной кривой при изотермических условиях:

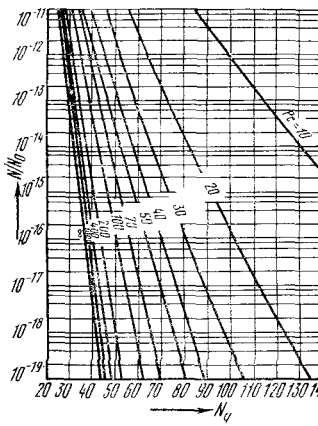


Рис. 22. Изменение относительного количества выживших в ходе стерилизации микроорганизмов (N/N_0) в зависимости от скорости разрушения ($N_ч$) при различных значениях числа Пекле.

$$N = N_0 \exp(-k\tau)\left[1 + k\tau + \frac{(k\tau)^2}{2!} + \ldots + \frac{(k\tau)^{m-1}}{(m-1)!}\right] F(\tau). \qquad (154)$$

$F(\tau)$ характеризует долю жидкости, находившуюся в трубчатом выдерживателе в течение времени τ_i. Для случая, когда время распределения изучают с помощью индикаторного вещества:

$$F(\tau) = \frac{G_i}{G_0} = \frac{c_i V_i}{\Sigma(c_i V_i)}, \qquad (155)$$

где G_i — измеренное количество индикатора за период времени τ_i; G_0 — исходное количество индикатора; c_i — концентрация индикаторного вещества; V_i — объем раствора индикатора, протекающего в точке измерения за интервал времени измерения τ_i.

Очевидно, что для условий с переменной температурой стерилизации уравнения (153) и (154) должны записываться в ином виде. В случае отмирания популяции по экспоненте:

$$N = N_0 \exp(-\nabla) F(\tau). \qquad (156)$$

В случае отмирания по S-образной кривой:

$$N = N_0 \exp(-\nabla)\left[1 + \nabla + \frac{\nabla^2}{2!} + \ldots + \frac{\nabla^{m-1}}{(m-1)!}\right] F(\tau). \quad (157)$$

Если известна кривая распределения температур вдоль трубчатого выдерживателя, то эффективность стерилизации можно рассчитать по формуле

$$N = N_0 \frac{\int_0^\infty F(\tau) \exp(-\nabla)\, d\tau}{\int_0^\infty F(\tau)\, d\tau}. \quad (158)$$

Следует отметить, что вместе с уравнениями типа (156—158) нужно решать и уравнения, характеризующие убыль наиболее ценных компонентов жидкости, которые определяют ее полезность в технологии получения целевого продукта. Например, убыль сахаров в водном растворе в процессе стерилизации при переменной температуре можно определить из уравнений [47, 52]:

$$X_c = X_a [1 - \exp(-\vartheta_p)] \text{ для } X_c > 10\%, \quad (159)$$

$$X_c = X_a \vartheta_p \text{ для } X_c < 10\%, \quad (160)$$

где X_c — количество разложившегося сахара, %; X_a — первоначальное содержание сахара в растворе до его стерилизации, принимаемое за 100%; ϑ_p — интегральный эффект разложения сахара, определяемый из выражения

$$\vartheta_p = A' \int_0^\tau \exp(-E'/RT)\, d\tau, \quad (161)$$

где A' — стерический фактор в уравнении Аррениуса, характеризующий общее число соударений молекул; E' — энергия активации процесса разрушения сахара. Остальные обозначения прежние.

Для постоянной температуры стерилизации:

$$X_c = X_a [1 - \exp(-k_c' \tau)] \text{ для } X_c > 10\%, \quad (162)$$

$$X_c = X_a k_c' \tau \text{ для } X_c < 10\%. \quad (163)$$

Принципиальный состав одной из возможных моделей при решении задачи оптимизации режимов термической стерилизации приведен выше (см. уравнение 148).

Расчет трубчатого выдерживателя должен включать несколько этапов. На первом обосновывают требуемую

эффективность стерилизации (N/N_0), исходя из особенностей технологии получения данного продукта. Из номограммы, представленной на рис. 22, находят значения $k\tau_{ср}$ при Pe=50. Необходимо помнить, что скорость инактивации посторонней микрофлоры зависит от температуры. Поэтому, задаваясь температурой стерилизации, находят из табл. 10 удельную скорость гибели микроорганизмов, а из соотношения $k\tau_{ср}$ — значение $\tau_{ср}$. Из соотношения $V_р = V_с\tau_{ср}$ вычисляют вместимость аппарата $V_р$, зная расход стерилизуемой жидкости $V_с$, который определяют на основе требуемой продолжительности загрузки ферментатора. Затем находят остальные характеристики трубчатого выдерживателя, пользуясь следующими соотношениями:

$$Pe = \frac{0,158}{Re^{0,125}}, \tag{164}$$

$$V_{ср} = V_с/0,785d^2, \tag{165}$$

$$d_т = \left(\frac{4V_с\rho}{\pi\mu}\right)^{0,0385}\left(\frac{2V}{\pi Pe}\right)^{0,307}, \tag{166}$$

где $d_т$ — диаметр трубчатого выдерживателя.

Применительно к непрерывному методу стерилизации неоднократно отмечалась значимость размера имеющихся в жидкости частиц, скорость прогревания которых меньше таковой для основной массы жидкости. Продолжительность прогревания частиц шарообразной формы можно оценить ориентировочно расчетным путем или учесть практически в соответствии с предложенными рекомендациями [123]. По этим рекомендациям необходимо либо повысить температуру стерилизации на 1—1,5° С по сравнению с расчетной, либо учесть продолжительность прогревания:

Размер частиц	Продолжительность прогревания
1 мкм	1 мкс
10 мкм	0,1 мс
100 мкм	10 мс
1 мм	1 с
1 см	100 с

Такая принципиальная схема расчета не исчерпывает всех вопросов, возникающих при разработке оптимальных режимов стерилизации и выборе параметров технической системы для их реализации. Создание ме-

тодики, учитывающей весь комплекс научно-прикладных задач, является одним из необходимых шагов на пути получения стерильных жидкостей со стандартными свойствами.

5.4. Результаты экспериментов по стерилизации некоторых жидкостей

К сожалению, опубликовано недостаточное число работ, в которых содержались бы данные об изменении определенных характеристик жидкости под влиянием стерилизующих факторов. Еще меньше данных о количественной оценке эффективности режимов стерилизации, основывающейся на кинетических характеристиках процессов инактивации посторонней микрофлоры и ухудшения полезных свойств жидкостей.

Как правило, в работах различных авторов указывается режим термической стерилизации (сочетание температуры и продолжительности ее воздействия) с пояснением, что при этом режиме жидкость была стерильной. Иногда приводятся данные, подобные представленным в табл. 24, однако при этом не указыва-

Таблица 24. **Влияние режимов стерилизации питательной среды на содержание витамина [106]**

Температура, °С	Время, мин	k, мин$^{-1}$	∇*	Доля нераспавшегося витамина, %
120	24,8000	1,5	37,2	0,0
128	4,1000	9,0	37,0	0,0
136	0,7200	50,0	36,0	2,3
144	0,1400	270,0	37,8	28,0
153	0,0290	—	—	64,0
161	0,0061	—	—	89,0

* Значения рассчитаны нами по экспериментальным данным [106].

ются состав среды и соотношение между различными ее компонентами до и после стерилизации. Однако эти данные исключительно полезны тем, что показывают: равные значения критерия стерилизации еще не гарантируют сохранения равных количеств термолабильных компонентов сред.

Для дальнейшего развития методических подходов к обоснованию оптимальных режимов стерилизации жидкостей очень полезны экспериментальные данные, полученные в пищевой промышленности применительно к термической обработке водных растворов сахаров [23, 32, 74, 75]. Эти данные указывают на необходимость глубокого изучения свойств жидкостей, подвергаемых одновременному воздействию повышенной температуры и величины pH. Графически основные результаты представлены на рис. 23, *а—д*.

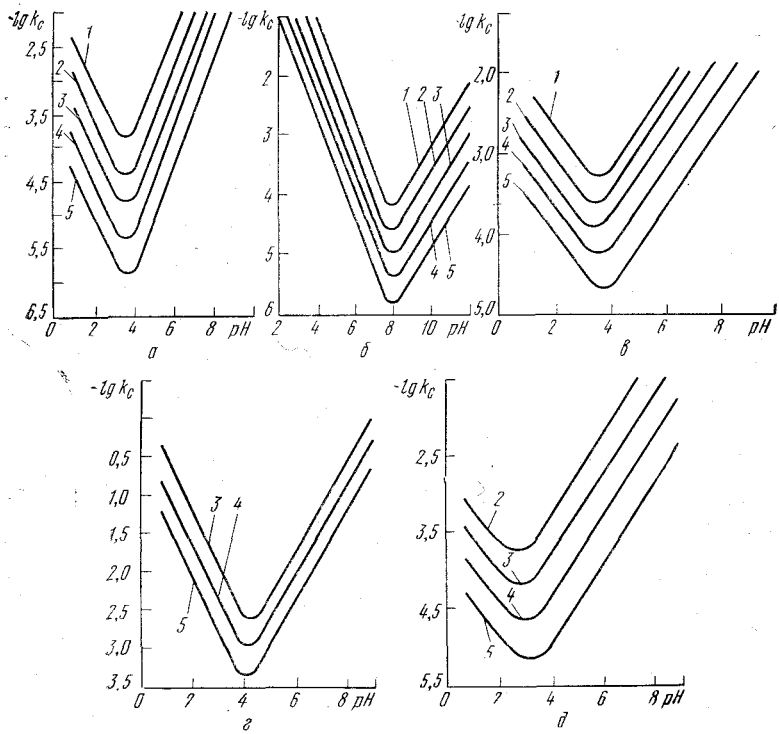


Рис. 23. Изменение скорости разложения некоторых сахаров в зависимости от pH при различной температуре:

а — глюкоза; *б* — сахароза; *в* — фруктоза; *г* — мальтоза; *д* — арабиноза; *1* — при 140° С; *2* — при 130° С; *3* — при 120° С; *4* — при 110° С; *5* — при 100° С.

Изменения константы скорости разложения сахаров в зависимости от pH при различной температуре

представлены в виде серий эквидистантных кривых с выраженным минимумом, соответствующим значению pH, при котором разложение сахара минимальное. Важно отметить, что для каждого исследованного сахара существует свое оптимальное значение pH: для глюкозы — 3 (рис. 23, *а*), для сахарозы — 8,5 (рис. 23, *б*), для фруктозы — 4 (рис. 23, *в*), для мальтозы — 4 (рис. 23, *г*), для арабинозы — 3,5 (рис. 23, *д*). Кроме того, скорость разложения всех исследованных сахаров от величины pH зависит в бо́льшей степени, чем от температуры. Поэтому соответствующие режимы стерилизации, предполагающие использование пониженной температуры, нельзя рассматривать как обоснованные, направленные на обеспечение стандартности и качества стерильных растворов, а также минимального разложения сахаров. Приведем некоторые результаты, полученные в серии опытов при стерилизации водных растворов сахаров и позволяющие количественно охарактеризовать эффективность режимов стерилизации (табл. 25).

Таблица 25. **Режимы термической стерилизации растворов глюкозы в 0,5 М фосфатном буфере**

Продолжительность, мин			pH раствора после стерилизации	$Э_р^н$	$Э_р^в$	$Э_р^{охл}$	$\Sigma Э_р$
нагревания от 100°С до $t_{ст}$	выдержки при $t_{ст}$	охлаждения от $t_{ст}$ до 100°С					
36	26	30	6,33	0,0756	0,1334	0,0630	0,2720
37	27	30	6,35	0,0777	0,1385	0,0630	0,2792
34	23	30	6,36	0,0714	0,1180	0,0630	0,2524
36	22	30	6,33	0,0756	0,1129	0,0630	0,2515
36	22	30	6,31	0,0756	0,1129	0,0630	0,2515
33	22	32	6,36	0,0693	0,1129	0,0672	0,2494
32	25	31	6,35	0,0672	0,1282	0,0651	0,2615
31	26	30	6,37	0,0651	0,1334	0,0630	0,2615
33	24	32	6,41	0,0693	0,1231	0,0672	0,2596

Значения интегрального эффекта разложения определяли по предложенной нами формуле [52]

$$Э_р^{\partial} = Э_р^{т} \frac{\tau}{t_{ст} - t_н} a, \qquad (167)$$

где $Э_р^д$ — действительное значение величины интегрального эффекта разложения сахара; $Э_р^т$ — табличное значение величины интегрального эффекта при скорости изменения температуры 1° С/мин; $t_{ст}$ — температура стерилизации; $t_н$ — температура, принимаемая за начальную при нагревании, и за конечную при охлаждении раствора; a — коэффициент, равный 1° С/мин.

Целесообразность учета стерилизующего эффекта стадий нагревания и охлаждения даже в лабораторных условиях иллюстрируется данными табл. 26.

Таблица 26. **Результаты определения количества разложившейся глюкозы с помощью экспериментального и расчетного методов**

Исходное содержание глюкозы, %	Конечное содержание глюкозы, %			Относительная ошибка, %	
	эксперимент	расчет			
		обычный метод	метод с $Э_р$	обычный метод	метод с $Э_р$
16,2	12,8	14,2	12,3	—12,3	+3,9
16,7	12,9	14,5	12,6	—12,4	+2,3
16,9	13,0	15,0	13,1	—15,4	—0,8
16,6	13,8	14,8	12,9	—7,2	+6,5
16,8	13,8	15,0	13,1	—8,7	+5,1
18,0	14,5	16,1	14,0	—11,0	+3,4
16,8	13,0	14,8	13,0	—13,8	0
16,7	13,1	14,6	12,9	—11,4	+1,5
15,7	12,6	13,9	12,1	—10,3	+4,0

Относительную ошибку оценивали из соотношения

$$\bar{\delta} = \frac{C_{экс} - C_р}{C_{экс}} \cdot 100, \qquad (168)$$

где $\bar{\delta}$ — относительная ошибка, %; $C_{экс}$ — содержание глюкозы в растворе, определенное экспериментальным путем; $C_р$ — то же, но определенное расчетным методом.

Методический подход [47, 52] может быть распространен и на другие подлежащие стерилизации растворы, содержащие по одному веществу строго определенного состава (раствор аминокислоты, фосфата и др., т. е. вещества, разложение которых в тепловом поле количественно характеризуется с помощью известных методов химической кинетики). Экспериментальное изучение констант термической устойчивости веществ A' и E', а также констант скорости разложения и их изменения в зависимости от температуры и pH являет-

ся одним из необходимых условий решения задач по оптимизации режимов стерилизации таких жидкостей. Эти же данные можно использовать и при переходе к непрерывному способу стерилизации.

Непременным требованием при определении констант термической устойчивости является обеспечение изотермических условий во всех точках стерилизуемой жидкости. Эксперименты нужно проводить в специальных установках [62, 139]. При этом для температуры ниже 130° С можно применять различные модификации капиллярного метода, а для более высокой температуры — динамический метод, в основе идентичный методу непрерывной стерилизации.

5.5. Пути повышения эффективности режимов стерилизации жидкостей

Анализ состояния вопросов стерилизации жидкостей в технологии микробиологических производств позволяет заключить, что решение проблемы получения стерильных жидкостей стандартного состава еще далеко от завершения. С одной стороны, это объясняется исключительной сложностью выявления необходимых закономерностей, а с другой, отсутствием должного внимания специалистов различного профиля к проблеме.

Одной из важных причин такого положения является отсутствие необходимых теоретических разработок в области биотехнологии как науки, которые позволили бы оценивать взаимосвязи кинетических закономерностей развития популяций и закономерностей приобретения ими нужных свойств с кинетикой процессов получения и изменения свойств жидкостей (в первую очередь питательных сред). Поэтому одним из главных представляется путь развития теоретических и прикладных исследований, связанных с гарантированным получением стерильных жидкостей данного состава независимо от масштабов их получения и способов стерилизации. Первым шагом в этом направлении должно быть теоретическое и экспериментальное изучение кинетики процессов, связанных с получением и обработкой жидкостей. Изучение скоростей процессов, их количественная характеристика, формулировка критериев

оптимизации, последующая оптимизация комплекса взаимосвязанных процессов и стадий позволят значительно приблизиться к решению указанной выше задачи.

Необходимо отметить и низкий уровень изученности стадий, предшествующих стерилизации жидкостей. Рассмотрим это на примере получения гидролизных питательных сред, когда в качестве исходного сырья используют белково-витаминные концентраты, дрожжи и другие компоненты, гидролизуемые с помощью кислот или ферментов. При кислотном гидролизе, как правило, фиксируется тепловой эффект только стадии выдержки гидролизуемой смеси при заданной температуре (например, 1 ч при 130°С). Фактически не учитывается гидролизующий эффект стадий нагревания и охлаждения, хотя последние вносят существенный вклад в общий эффект, особенно в промышленных аппаратах. Количественная характеристика интегрального эффекта гидролизующего действия с учетом всех стадий должна проводиться еще на лабораторном уровне. В этом случае гарантируется бóльшая стандартность гидролизатов, а значит, и питательных сред не только на лабораторном, но и на промышленном уровне.

При обработке и стерилизации многих жидкостей еще не в полной мере используется опыт работы смежных отраслей промышленности. Например, не учитывается опыт пищевой промышленности по исключению вредного влияния кислорода на качество стерилизуемых жидкостей. Осуществление всех процессов приготовления, обработки и временного хранения жидкостей в герметизированных аппаратах, удаление растворенного в жидкостях кислорода явятся одним из важных факторов повышения качества стерильных жидкостей.

Наконец, необходимо самое тщательное изучение компонентов питательных сред, лимитирующих развитие целевых микроорганизмов. Требуется получить кинетические характеристики процессов не только развития популяций микроорганизмов, но и приобретения ими нужных свойств или накопления целевых продуктов с учетом кинетики потребления питательных веществ, содержащихся в жидкости.

Особое внимание необходимо уделить изучению процессов приготовления и стерилизации пеногасите-

лей. Их многообразие и сложный состав требуют от технологов всесторонней оценки режимов стерилизации не только с позиций гарантированного подавления посторонней микрофлоры, но и учитывая необходимость сохранения пеногасящих и других полезных свойств. Таким образом, специалисты, и в этом случае должны прийти к решению задачи оптимизации процесса стерилизации пеногасителей как совокупности частных процессов, относящихся к микробиологии (инактивация микрофлоры) и физической химии.

6. СТЕРИЛИЗАЦИЯ ВОЗДУХА

6.1. Особенности работы систем, обеспечивающих получение стерильного воздуха

Для нормального функционирования современных микробиологических производств требуется большое количество стерильного воздуха. Например, в один цех для получения антибиотиков, состоящий из 20 аппаратов вместимостью по 50 м^3, только на аэрацию культуральной жидкости нужно ежечасно подавать десятки тысяч кубометров стерильного воздуха. Такой воздух необходим и для осуществления процессов передавливания чистых культур микроорганизмов или стерильных жидкостей, для создания необходимых условий работы в лабораторных помещениях. Таким образом, получение стерильного воздуха с нужными параметрами (температура, влажность, давление) — одна из важных проблем при обеспечении работы микробиологического предприятия, получающего чистые культуры микроорганизмов. Задачи приготовления такого воздуха и транспортировки к местам потребления (в цехи и лаборатории) решают с помощью специализированных технических систем. Остановимся на некоторых требованиях к их работе.

Одним из главных требований, безусловно, является гарантированная стерильность воздуха, подаваемого в аппараты и лабораторные помещения. По-видимому, степень стерильности должна определяться содержанием той операции, в которой используется воздух. Например, степень очистки воздуха, подаваемого на аэра-

цию культуральной жидкости, во многих случаях должна быть выше, чем для воздуха, подаваемого в лабораторные помещения для поддержания в них необходимых гигиенических условий. Важным требованием является обеспечение необходимых термодинамических характеристик воздуха. Так, повышенное содержание влаги может привести к замачиванию фильтров и последующему увеличению их коэффициента проскока по бактериальному аэрозолю. Низкая температура воздуха, подаваемого в ферментаторы, приведет к переохлаждению культуральной жидкости, а недостаточное давление не обеспечит преодоления сопротивления гидростатического столба жидкости, а следовательно, и требуемой эффективности аэрации. Именно в этом плане необходимо обеспечение заданного расхода и точности подачи воздуха.

Очевидно, что технические системы получения и транспортировки стерильного воздуха должны быть весьма надежными, достаточно простыми по устройству и обслуживанию.

Рассмотрим принципиальную схему такой системы на рис. 24. Воздух, забираемый из окружающей атмосферы, предварительно очищается от пыли в фильтре *1*,

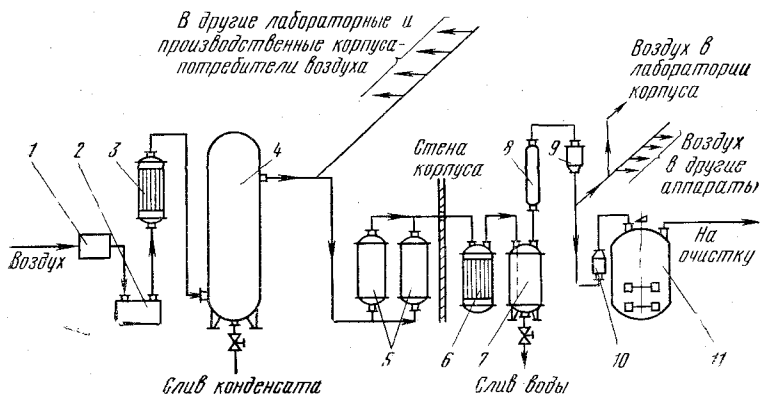


Рис. 24. Принципиальная схема получения и транспортировки стерильного сжатого воздуха на микробиологическом предприятии:

1 — фильтр на входе воздуха в компрессорную; *2* — компрессор; *3* — теплообменник-охладитель; *4* — ресивер; *5* — предфильтры на входе в производственный корпус; *6* — теплообменник-охладитель; *7* — каплеотбойник; *8* — подогреватель воздуха; *9, 10* — фильтры тонкой очистки воздуха; *11* — ферментатор.

сжимается в компрессоре *2* до требуемого давления и одновременно нагревается до 120—220° С, а затем охлаждается до рабочей температуры в теплообменнике *3*. После этого он поступает в воздухосборник *4* и далее в магистральный воздухопровод, от которого идут ответвления к производственным и лабораторным корпусам. На рис. 24 показан и пример ввода воздухопровода в здание. Воздух поступает в фильтры предварительной очистки *5*, охлаждается в теплообменнике *6*, освобождается от капельной влаги в концевом водоотделителе *7*, подогревается в теплообменнике *8*, очищается от посторонней микрофлоры в фильтре *9*, а затем по одной ветви подается к индивидуальным фильтрам *10* ферментаторов, а по другой — в лаборатории здания, в том числе и в микробиологические боксы. Таким образом, концентрация посторонней микрофлоры снижается практически в каждом из технических устройств системы, в том числе и по длине трубопроводов. Однако окончательная стерилизация воздуха осуществляется в фильтрах тонкой очистки, число которых на входе в аппараты и помещения определяется особенностями протекающих процессов.

Очевидно, что при оценке эффективности системы в отношении воздействия на постороннюю микрофлору следует иметь в виду суммарный коэффициент проскока K_Σ.

$$K_\Sigma = \prod_{i=1}^{n} K_i, \qquad (169)$$

где i — число узлов и элементов системы ($i=1, 2, 3, \ldots, n$); K_i — коэффициент проскока узла и (или) отдельного элемента системы.

Остановимся на особенностях устройства и работы аппаратов, входящих в состав технических систем получения и транспортировки стерильного воздуха, основываясь на данных работ [10, 28, 65, 76]. Пылинки из воздуха удаляются в аппаратах самых различных конструкций, в том числе пылеулавливающих камерах, циклонах (мультициклонах), а также в жалюзийных и других инерционных пылеотделителях. В работе [28] после сравнения различных типов пылеотделителей приводится следующая их характеристика:

пылеотстойные камеры не сложные по конструкции,

дешевые, имеют незначительное сопротивление, но отделяют только грубую пыль;

гравитационные устройства также не сложные по конструкции, имеют сопротивление около 50 Па, способны улавливать пыль с размером частиц более 10 мкм;

инерционные пылеотделители при степени очистки 60—70%, улавливают пыль с частицами размером более 5 мкм; сопротивление пылеотделителей около 400 Па.

В настоящее время для очистки воздуха от пыли чаще применяют тканевые и металлические висциновые фильтры. Гидравлическое сопротивление тканевых фильтров потоку воздуха определяется уравнением

$$\Delta p = \frac{32 l w_{\Phi} \mu'}{d_{\text{в}}^2}, \qquad (170)$$

где Δp — сопротивление фильтра; l — истинная длина извилистых пор; w_{Φ} — средняя скорость протекания воздуха через поры; $d_{\text{в}}$ — внутренний диаметр пор; μ' — коэффициент вязкости запыленного воздуха.

Как показывает опыт работы тканевых фильтров, сопротивление фильтровальной ткани изменяется прямо пропорционально скорости протекания воздуха. По мере накопления пыли сопротивление возрастает и линейность характеристики $\Delta p = f(w_{\Phi})$ нарушается. Рекомендуется предельное сопротивление фильтра 100 Па, а в виде исключения — до 250 Па при допустимой удельной нагрузке 150—350 м³/(м²·ч) и скорости фильтрации не более 0,5 м/с [28]. Для воздушных компрессорных цехов на крупных микробиологических производствах, по-видимому, целесообразно применять кассетные фильтры со смачиваемой маслом развитой поверхностью. Кассеты, как правило, — квадратные рамы, затянутые с обеих сторон жесткой металлической сеткой. Между сетками находятся плотно набитые латунные или алюминиевые трубочки. Чистые фильтры имеют сопротивление 50 Па, а забитые пылью — 80—100 Па.

Эффективность работы фильтров для очистки воздуха от пыли характеризуется коэффициентом очистки:

$$\eta_{\Phi} = \frac{S_{\text{вх}} - S_{\text{вых}}}{S_{\text{вх}}} \cdot 100, \qquad (171)$$

где $\eta_ф$ — коэффициент очистки, %; $S_{вх}$ — количество пыли в воздухе до фильтра; $S_{вых}$ — то же после фильтра.

Диапазон возможного варьирования значений $\eta_ф$ для различных условий:

Пылеотделители	Значения $\eta_ф$, %
Пылевые камеры	20—60
Циклоны и инерционные пылеотделители	40—70
Тканевые фильтры	70—90
Металлические фильтры	80—85

Часто для характеристики работы фильтров пользуются соотношением [28]

$$\psi_с = h_1/q_ф, \tag{172}$$

где $\psi_с$ — коэффициент сопротивления; h_1 — сопротивление фильтра; $q_ф$ — удельная нагрузка на фильтр.

Необходимой характеристикой фильтров является их пылеемкость, т. е. количество пыли, которое может накопиться в фильтре между двумя очередными чистками и которое еще допускает возможность эксплуатации фильтра. Пылеемкость определяется из выражения

$$П_ф = \frac{h_2 - h_1}{\varphi} F_ф, \tag{173}$$

где $П_ф$ — пылеемкость фильтра; $F_ф$ — площадь рабочей поверхности фильтра; h_1 и h_2 — сопротивление фильтра до и после чистки соответственно; φ — удельный рост сопротивления, равный для кассетных фильтров 0,2—0,3 [28].

В микробиологической промышленности наибольшее распространение получили центробежные компрессоры и турбокомпрессоры, обеспечивающие получение сжатого воздуха с давлением менее 0,6 МПа в количестве 50—200 м³/мин и более. Важным моментом для инактивации посторонней микрофлоры является нагрев воздуха в компрессоре до 120—220° С, что, несомненно, существенно влияет на снижение содержания вегетативной микрофлоры.

Нагретый воздух после охлаждения в теплообменнике *3* (см. рис. 24) поступает в воздухосборник *4*, который должен улавливать влагу и масло, аккумулировать некоторый запас сжатого воздуха для покрытия неожиданных и кратковременных нагрузок, а так-

же смягчать толчки от поршневых компрессоров. Как правило, на воздухопроводе перед его входом в здание устанавливают так называемые набивные фильтры (см. рис. 24, *5*), предназначенные для предварительной очистки воздуха от посторонней микрофлоры. Коэффициент проскока таких фильтров по бактериальному аэрозолю не выше $1 \cdot 10^{-2}\%$, однако они существенно снижают обсемененность воздуха и облегчают его стерилизацию в последующем.

Теплообменник *6* (см. рис. 24) предназначен для охлаждения воздуха до температуры ниже точки росы. Выделяющаяся при этом влага удаляется в так называемом концевом водоотделителе. Обоснованных расчетов размера водоотделителя пока не опубликовано, однако рекомендуется [28] достигать эффекта удаления влаги за счет резкого снижения (в 20—60 раз) скорости воздуха. Эффективная работа водоотделителей помогает исключить замачивание фильтров окончательной очистки воздуха. Этой же цели служит и подогреватель *8*, в котором воздух нагревается до температуры 60—70° С и затем подается в фильтры *9* для окончательной очистки от посторонней микрофлоры.

Существует множество конструкций фильтров для стерилизации воздуха, например фильтры на основе волокнистых фильтрующих материалов [65], достаточно широко распространенных во многих микробиологических производствах, а также керамические и металлокерамические фильтры [147, 162].

6.2. Методы и режимы получения стерильного воздуха

Фильтрация. В практике работы микробиологических производств наиболее распространен метод стерилизации воздуха путем фильтрации, предполагающий использование фильтров различных конструкций с различными материалами для задержки посторонней микрофлоры. Рассмотрим некоторые из этих фильтров.

По-видимому, до сих пор в промышленности чаще всего применяют волокнистые фильтры, оптимальная конструкция которых достаточно полно была описана еще в 1961 г. [122]. Существует несколько способов характеристики эффективности работы этих фильтров. Например:

$$\lg (N_1/N_2) = L_ф/L_{90}, \qquad (174)$$

где L_{90} — толщина фильтрующей насадки, обеспечивающая 10-кратное снижение концентрации микроорганизмов; N_1, N_2, $L_ф$ (см. 85).

Величины L_{90} для некоторых материалов приведены в табл. 27.

Таблица 27. **Толщина фильтрующей насадки, обеспечивающая 10-кратное снижение концентрации микроорганизмов в воздухе [122]**

Материал	Средний диаметр волокон d_f, мкм	Микроорганизм	Скорость воздуха, м/с	L_{90}, мм
Стекловолокно	16,0	Bac. subtilis, споры	0,03	38,1
			0,15	88,9
			0,30	117,0
			1,50	15,3
			3,00	3,8
Стекловолокно № 800	8,5	Бактериофаг Т-2	0,03	4,1
			0,15	6,1
			0,30	7,1
			1,50	8,6
			3,00	11,2

Данные табл. 27 позволяют сделать некоторые замечания, имеющие практическое значение. Во-первых, задерживающая эффективность фильтров в отношении спор зависит от скорости воздушного потока. Во-вторых, существует скорость, при которой задержка спор минимальная. Снижение и увеличение этой скорости повышают эффективность фильтра. В-третьих, при задержке фага не наблюдается зависимость, характерная для задержки спор микроорганизмов, следовательно, конструкции фильтров для фагов и спор должны быть различными. При необходимости удаления из воздуха фаговых частиц и бактерий нужна последовательная установка фильтров отличающихся конструкций.

Величины критических скоростей воздуха для различных условий приведены в табл. 28. Плотность частиц принята за единицу.

Поскольку эффективность фильтрации зависит от размеров частиц, специалистам микробиологических производств, занимающимся конструированием, проверкой и эксплуатацией фильтров, необходимо иметь

Таблица 28. **Критические скорости воздуха $V_{кр}$ (в м/с) для улавливания частиц волокон из воздуха, имеющего комнатную температуру [122]**

Диаметр частиц $d_р$, мкм	Диаметр волокон $d_ƒ$, мкм			
	1	4	10	20
Давление 0,1 МПа				
1,00	0,017	0,067	0,168	0,332
0,75	0,032	0,127	0,318	0,636
0,50	0,078	0,313	0,783	1,566
Давление 0,2 МПа				
1,00	0,015	0,061	0,154	0,307
0,75	0,028	0,113	0,304	0,568
0,50	0,068	0,268	0,661	1,322

представление о размерах бактериальных частиц (табл. 29). Мелкие частицы улавливаются труднее, по-

Таблица 29. **Размеры (в микрометрах) некоторых бактериальных клеток [122]**

Вид бактерий	Диаметр	Длина
Вегетативные клетки		
Aerobacter aerogenes	1,0—1,5	1,0—2,5
Bac. cereus	1,3—2,0	8,1—25,8
Bac. licheniformis	0,5—0,7	1,8—3,3
Bac. megatherium	0,9—2,1	2,0—10,0
Bac. mycoides	0,6—1,6	1,6—13,6
Bac. subtilis	0,5—1,1	1,6—4,8
Micrococcus aureus	0,5—1,0	0,5—1,0
Proteus vulgaris	0,5—1,0	1,0—3,0
Споры		
Bac. megatherium	0,6—1,2	0,9—1,7
Bac. mycoides	0,8—1,2	0,8—1,8
Bac. subtilis	0,5—1,0	0,9—1,8

этому при создании волокнистых фильтров целесообразно ориентироваться на размер частиц не более 0,5 мкм.

Создание фильтров на основе волокнистых материалов включает несколько этапов. На первом определяют требования к фильтру, задаваясь концентрацией микроорганизмов в воздухе до фильтрации и допустимой вероятностью проникновения одного микроорганизма через фильтр. На втором этапе рассчитывают толщину фильтрующей насадки, при которой обеспечивается требуемая эффективность. При отсутствии необходимых экспериментальных данных эффективность вычисляют для условий, когда улавливание микроорганизмов происходит только за счет захвата, т. е. для такой скорости воздуха, при которой действие сил инерции можно не учитывать. На следующем этапе выбирают площадь поперечного сечения фильтра с таким расчетом, чтобы затраты на его изготовление и эксплуатацию были минимальными. На последнем этапе сравнивают оптимальные конструкции фильтров из различных фильтрующих материалов. При равной эффективности ориентируются на фильтр, требующий минимальных затрат.

Фильтры на основе тонких волокон относятся к так называемым «глубинным» фильтрам, принцип действия которых основан на фильтрации воздуха по всей глубине материала. Для их изготовления в настоящее время используют не только волокнистые, но и порошкообразные прессованные материалы, а также пластики на бумажной и асбестовой основе [147]. Вероятность задержки микроорганизмов в таких фильтрах связана статистически с глубиной фильтрующего слоя, вследствие чего теоретически нельзя удалить из воздушного потока 100% находящихся в нем микроорганизмов. Если фильтры используются в течение длительного времени, то скопившиеся на них микроорганизмы могут размножаться (особенно при высокой влажности), а в дальнейшем проникать на чистую сторону фильтра. Это явление характерно для роста мицелия, т. е. наиболее опасно в производстве антибиотиков [147].

Так называемым «ситчатым» фильтрам свойственна абсолютная эффективность (100%). Механизм их действия подобен работе сита. Частицы и микроорганизмы удерживаются на поверхности потому, что на ней отсутствуют поры, размер которых достаточен для проникновения микроорганизмов. Таким образом, для

задержки частиц и микроорганизмов размером более 0,5 мкм следует выбирать мембранный фильтр, диаметр пор которого постоянный и не превышает 0,5 мкм.

Мембранные фильтры, выпускаемые фирмой «Миллипор», представляют собой тонкие пористые слои материала на основе эфира целлюлозы толщиной около 150 мкм. Через эти слои в перпендикулярном направлении проходят поры правильной формы, обеспечивающие функционирование слоя как абсолютного фильтра. Очень важна равномерность распределения пор по размеру.

Керамические свечи и фильтры из спекшегося материала (например, металлокерамические), которые обеспечивают определенную степень задержки микроорганизмов на поверхности, до последнего времени не применялись для стерилизации больших объемов воздуха вследствие очень высокого сопротивления воздушному потоку. Причина этого явления заключается в повышенной плотности упаковки материала фильтров. В то же время мембранные фильтры являются достаточно открытыми структурами. Так, в фильтре с размером пор 0,45 мкм объем пустот составляет 80%. Это означает, что, обладая не меньшей пропускной способностью на единицу площади, мембранный фильтр превосходит по производительности волокнистые глубинные фильтры.

Поскольку микроорганизмы не могут проходить через мембранный фильтр из-за меньшего размера его пор, то такой фильтр может сохранять 100%-ную эффективность при обработке как воздуха, так и воды. Ферментаторы часто подвергаются воздействию экстремальных величин температуры и влажности. Даже при значительном скоплении влаги (несколько литров воды) в системе стерилизации «Миллипор» не отмечалось нарушения режимов аэрации по скорости воздушного потока и эффективности его стерилизации [147].

Обычно, говоря о промышленном использовании мембранных фильтров, указывают на два недостатка: ломкость и низкую пылеулавливающую способность. При любом процессе ни глубинный, ни ситчатый фильтр не может осуществить экономичную стерильную фильтрацию больших объемов среды. Таким образом, проблемы «превосходства» одного фильтра над другим не

существует. Она заключается лишь в выборе правильной функции для каждого типа фильтра и оптимальном их сочетании. При использовании мембранных фильтров, для которых характерна 100%-ная задерживающая способность, следует применять предварительную подготовку воздуха. Для этой цели можно использовать глубинные фильтры, которые 100%-ную задержку любых частиц не обеспечивают, но обладают большой емкостью. Проблема ломкости мембранных фильтров уже разрешена путем введения фильтр-патрона («Миллитьюб»), изготовленного путем обертывания материала мембранного фильтра вокруг пористого полипропиленового стержня, закрепленного между двумя заглушками и покрытого прочным пористым пластмассовым чехлом. Кроме этого, для решения проблемы загрязнения к патрону для стерилизации воздуха в качестве предфильтра добавляют слой микростекловолокнистого материала. Интересно, что этот материал фильтра предварительной очистки обладает эффективностью, сравнимой с эффективностью материала, используемого в некоторых патронах из стекловолокна и рекомендуемого для стерилизации воздуха.

Для практического использования фильтр-патроны «Миллитьюб», описанные выше, включены в корпуса патронов «Аэротьюб». Например, система «Аэротьюб-1», содержащая один патрон «Миллитьюб» (разработанный в качестве стерилизующей системы для аэрации полупромышленных ферментаторов и аналогичных операций небольшого масштаба), может стерилизовать 2,8 м^3 воздуха в минуту при перепаде давления 0,1 МПа. Для аэрации ферментаторов большой вместимости при незначительном перепаде давления требуется большая площадь мембранного фильтра. Эта задача решается путем использования нескольких фильтрующих патронов. Так, фильтрующая система «Аэротьюб-20» включает 20 патронов «Миллитьюб» и имеет площадь фильтрации 2,4 м^2, обеспечивающую стерилизацию 70,8 м^3 воздуха в минуту. Важно также отметить, что фильтры стерилизуют водяным насыщенным паром под давлением, т. е. способом, наиболее приемлемым для микробиологических производств и получившим на них наибольшее распространение.

Стерилизация воздуха сжиганием. В некоторых ра-

ботах описан метод сжигания, выдержки воздуха, содержащего микрофлору, при повышенной температуре в течение заданного промежутка времени. Например, отмечена эффективная стерилизация воздуха при его расходе 25—50 л/мин в печи прокаливания [119]. Воздух подается во внутреннюю трубу непосредственно вдоль электронагревательного элемента и выводится через концентрическую наружную трубу, заполненную стружкой из нержавеющей стали. Общий внутренний объем «зоны реакции» составляет 3,3 л. При расходе воздуха 25 л/мин время пребывания составляет 8 с при комнатной температуре и 4 с при 300° С.

В табл. 30 приведены экспериментальные данные

Таблица 30. **Задерживающая эффективность печи при различной температуре**

Температура, °С		Выживаемость, %	Температура, °С		Выживаемость, %
по контрольной термопаре	по аварийной термопаре		по контрольной термопаре	по аварийной термопаре	
400	275	Менее 0,002	200	135	1
300	210	То же	150	107	34
250	175	»	20	20	35

по инактивации аэрозоля Bac. stearothermophilus в печи. При каждом выбранном значении температуры через печь пропускали 115 л воздуха, содержащего 400—1100 спор в 1 л. В случае без нагревания фиксировали 35% клеток на выходе из печи.

При всех исследованных значениях температуры (измерены с помощью контрольной термопары), начиная с 250° С и выше, микроорганизмы не были обнаружены (выживаемость менее 0,002%). Температура на аварийной термопаре, помещенной немного далее половины пути воздушного потока, составляла 170—180° С. Для получения бóльшей гарантии инактивации всех микроорганизмов температура воздуха в этой точке должна составлять 300° С [119]. Это соответствует температуре нагревателя 500—600° С. При аварийных ситуациях в работе печи (например, снижение температуры) поступление воздушного потока из ферментатора в печь и атмосферу можно легко прекратить путем

автоматического перекрытия клапанов на воздушном коллекторе до и после печи.

Электрофильтрация. В литературе встречаются работы, посвященные изучению возможности применения электрофильтров для стерилизации воздуха [138]. В частности, отмечают, что электровоздушные фильтры способны осаждать частицы размером до 0,01 мкм. Очистка воздуха осуществляется в двух последовательно расположенных зонах. Первая из них (зона ионизации) находится под постоянным напряжением 13 000 В. Электроды из вольфрамовой проволоки обеспечивают положительный заряд всех частиц, содержащихся в воздухе. Во второй зоне частицы осаждаются на пластинчатом конденсаторе. Поступающие из зоны ионизации частицы при прохождении через зону осаждения отталкиваются от положительно заряженных пластин и, притягиваясь к заземленным пластинам, осаждаются на них. Для достижения высокой степени осаждения необходимо ограничивать скорость обрабатываемого воздуха, а также поддерживать стабильное напряжение в сети с точностью $\pm 5\%$.

Эффективность работы электрофильтров оценивают из выражения

$$\eta_4 = 1 - \exp(-fw), \qquad (175)$$

где η_4 — степень удаления частиц; f — удельная поверхность осаждения, т. е. суммарная поверхность заземления осадительных пластинок, приходящаяся на поток воздуха; w — скорость переноса частиц в электрическом поле, т. е. скорость движения заряженных частиц на их изогнутом в направлении к осадительным пластинкам пути.

Наиболее сложно определить величину w, зависящую от заряда частиц. Последний в свою очередь определяется гранулометрическим и химическим составом осаждаемых частиц, изменением силы тока и напряжения, скоростью воздуха внутри фильтра, рабочей температурой и относительной влажностью.

6.3. Результаты экспериментальной оценки задерживающей эффективности фильтров

Рассмотрим некоторые результаты, полученные при экспериментальной оценке задерживающей эффективности фильтров, которые предназначены для стерили-

зации воздуха. Так, изучено влияние скорости потока воздуха, размера частиц аэрозоля, их заряда и влажности среды на работу воздушных фильтров для субмикронных вирусных и бактериальных аэрозолей [118]. В качестве тест-аэрозолей использовали субмикронные аэрозоли бактериофага Т-1 (один из вирусов, поражающий E. coli, штамм В) со средним диаметром 0,12 мкм и бактериальные аэрозоли спор Bac. subtilis var. niger со средним диаметром 1 мкм. Испытывали как фильтрующие материалы со сверхвысокой задерживающей способностью, так и изготовленные из ткани.

Влияние скорости и заряда аэрозоля на проникновение субмикронных аэрозолей фага 11 через фильтрующие материалы со сверхвысокой задерживающей способностью показано в табл. 31. Скорость потока су-

Таблица 31. **Влияние скорости потока и заряда аэрозоля на проникновение (в %) субмикронных частиц с фагом 11 через фильтрующие материалы**

Скорость воздуха перед фильтром, м/мин	Проникновение через			
	стеклянную бумагу		стекло-асбестовую бумагу	
	без нейтрализации заряда	с нейтрализованным зарядом	без нейтрализации заряда	с нейтрализованным зарядом
0,335	0,0000005	0,000002	0,0000057	0,000021
1,12	0,0000160	0,000083	0,0003200	0,001400
5,18	0,0008200	0,002700	0,0120000	0,043000
20,73	0,0075000	0,017000	0,0830000	0,190000
45,7	0,0087000	0,016000	0,0860000	0,160000

щественно влияла на задерживающую эффективность. Это соответствует теории фильтрации воздуха, содержащего небольшие частицы, поскольку с увеличением скорости остается меньше времени для осаждения частиц за счет диффузии. Частицы с нейтрализованным зарядом обладают бóльшим проскоком, чем частицы с естественным зарядом.

Отмечено [118], что в настоящее время определяю-

щим является качество изготовления фильтров, поскольку разработаны материалы, свойства которых гарантируют задержку и вирусных, и бактериальных частиц. Справедливость этого замечания подтверждена в эксперименте: сами материалы оказались более эффективными, чем изготовленные из них фильтрующие элементы.

Получены типичные результаты испытаний систем очистки воздуха, проведенных с помощью аэрозоля хлорида натрия [110]. Системы включают два последовательно установленных фильтра (подсистемы № 1 и 2), соединенных между собой трубопроводом. Такие системы позволяют проводить независимую оценку эффективности каждого из фильтров (табл. 32).

Таблица 32. **Результаты испытаний системы двух последовательно установленных фильтров производительностью по 84 м³/мин каждый**

№ подсистемы	Концентрация до фильтра, мг/м³	Концентрация за фильтром, мкг/м³	Проскок, %
До устранения неисправностей			
1	7	44,0	0,630
2	9	2,4	0,027
После замены поврежденных фильтров в подсистеме № 1			
1	7	1,1	0,015
2	9	2,4	0,027

Итак, испытание на месте высокоэффективных установок для фильтрации воздуха дает возможность определить, достигнут ли запроектированный режим работы. Появляется возможность периодического контроля фильтров в ходе эксплуатации. Практическая полезность такого приема продемонстрирована и на фильтрах производительностью по воздуху 1000 м³/мин [110]. Аналогичный методический подход можно использовать в условиях любого микробиологического предприятия.

Опубликованы [45] результаты экспериментальной оценки задерживающей эффективности фильтров ФТО-

1000 (на 1000 нм³/ч) по аэрозолю Bact. prodigiosum (табл. 33). Заметим, что фильтрующие элементы изго-

Таблица 33. **Статистический ряд изменений коэффициента проскока фильтров ФТО-1000 по аэрозолю Bact. prodigiosum**

Разряд	Средняя разряда	Число наблюдений	Частота отклонений
0,00006—0,00012	0,00009	1	0,004
0,00012—0,00025	0,00018	1	0,004
0,00025—0,00050	0,00037	9	0,036
0,00050—0,00100	0,00075	40	0,158
0,00100—0,00200	0,00150	113	0,448
0,00200—0,00400	0,00300	68	0,270
0,00400—0,00800	0,00600	15	0,060
0,00800—0,01600	0,01200	2	0,008
0,01600—0,03200	0,02400	1	0,004
0,03200—0,06400	0,04800	1	0,004
0,06400—0,12800	0,09600	1	0,004

товлены не на специализированном заводе, а на микробиологическом предприятии.

Таким образом, для фильтрующих элементов характерно варьирование коэффициента проскока в широком диапазоне (коэффициент неоднородности изготовления равен 252%). Этот экспериментально установленный факт приводит к заключению о том, что каждый фильтрующий элемент, особенно изготовленный на месте, требует обязательной проверки на проскок либо на специализированном стенде, либо непосредственно в составе монтажной схемы.

В качестве одной из мер, направленных на гарантированное получение стерильного воздуха, целесообразно рекомендовать создание на каждом микробиологическом предприятии специализированного стенда для проверки фильтров на проскок, указывая в паспорте каждого фильтрующего элемента значения коэффициента проскока по бактериальному (или другому) аэрозолю, дату и условия проверки. Запас проверенных фильтров позволит избавить специалистов завода (в том числе и микробиологов) от неприятностей, связанных с контаминацией воздуха, а в последующем — культуральной жидкости, полупродуктов и конечных продуктов.

6.4. Пути совершенствования систем получения стерильного воздуха

Оценивая возможные пути совершенствования систем получения и транспортировки стерильного воздуха, основное внимание следует сосредоточить на создании фильтров не только высокоэффективно задерживающих микрофлору, но и надежно работающих в самых различных условиях микробиологического производства. Уже отмечалось мнение специалистов о том, что исключительно важно создать совершенные конструкции фильтров уже на основе имеющихся материалов, поскольку некоторые из них обладают, по существу, абсолютной задерживающей способностью. Несомненна необходимость создания и новых фильтрующих материалов, обладающих не только требуемым коэффициентом проскока, но и повышенной прочностью, гидрофобностью, равномерным распределением строго калиброванных по размерам пор, способностью работать в экстремальных условиях, в том числе и при резком изменении перепада давления на фильтре. Разработка материалов и конструирование фильтров — два тесно связанных направления, взаимно обогащающих друг друга и способствующих решению одной задачи.

Как правило, дефектом всех фильтров является отсутствие эффективного непрерывного контроля за их работой. Создание недорогих чувствительных систем, обеспечивающих обнаружение единичных микроорганизмов (или других тест-объектов) за фильтром и своевременно выдающих сигнал о нарушении процесса, должно быть в центре внимания и биотехнологов, и конструкторов. Наконец, для производств, испытывающих отрицательное влияние фага, важно разработать систему, предусматривающую очистку воздуха не только от бактерий, но и от фаговых частиц, а также взаимную компоновку отдельных фильтрующих элементов, которая обеспечивала бы надежное и экономичное получение действительно стерильного воздуха.

В методическом отношении необходим этап формулировки требований к системам получения гарантированно (с данной вероятностью) стерильного воздуха и различным элементам систем с учетом их предназначе-

ния и особенностей работы. Обоснованное сочетание различных технических устройств, обеспечивающих задержку и (или) инактивацию посторонней микрофлоры, а также поддержание требуемых параметров стерильного воздуха (давление, температура, влажность и др.) позволят создать более эффективные системы применительно к различным задачам микробиологических лабораторий и производств.

7. ГЕРМЕТИЗАЦИЯ ОБОРУДОВАНИЯ И КОММУНИКАЦИЙ

7.1. Особенности герметизации оборудования, коммуникаций, узлов и элементов, работающих в асептических условиях

В микробиологических производствах повышенное внимание к проблемам герметизации оборудования и коммуникаций обусловлено необходимостью решения двух взаимосвязанных задач: защиты технологических процессов от посторонней микрофлоры и защиты окружающей среды от продуктов и отходов микробиологического синтеза. Остановимся на вопросах, связанных с решением первой задачи, полагая, что методические подходы будут справедливы и для решения второй задачи.

При функционировании предприятий микробиологического профиля многочисленные аппараты самых различных конструкций эксплуатируются на всех стадиях технологического процесса, начиная от получения питательных сред и кончая фасовкой готовой продукции. В той или иной степени с вопросами герметизации сталкиваются на всех этапах производства, однако наиболее важным и сложным представляется этап достижения и поддержания необходимой герметичности аппаратов и трубопроводов при получении чистых культур микроорганизмов как в посевных аппаратах, так и в основных промышленных ферментаторах.

Главная особенность обеспечения герметичности в условиях микробиологического предприятия заключается в том, что герметичность должна достигаться и поддерживаться одновременно в комплексе взаимосвязанных аппаратов, объединяемых, как правило, в единые

технические системы. Например, в системе, состоящей из установки непрерывной стерилизации и ферментатора, герметичность должна гарантировать сохранение требуемой степени стерильности той или иной жидкости.

Существует много разнотипных систем (аппаратов, трубопроводов и др.), которые отличаются как по свойствам передаваемых материальных потоков, так и по условиям работы. Так, параметры работы системы подачи стерильного воздуха существенно отличаются от параметров системы стерилизации и транспортировки пеногасителя. Если в первом случае температура узлов и аппаратов практически не меняется и несущественно отличается от температуры производственных помещений, то во втором случае температура может периодически повышаться от 30 до 140° С, а затем снова снижаться до начального значения. Последний пример свидетельствует и о том, что даже для однотипных систем их характеристики не являются постоянными и значительно меняются в зависимости от фазы состояния системы (подготовка к работе, ведение основного процесса, его завершение и др.).

Кроме того, существует множество разнотипных герметизирующих элементов, отличающихся по конструкции и способу достижения герметичности. Вращающиеся валы герметизируются с помощью различных уплотнений, преимущественно торцевых, а места ввода различных контрольно-измерительных приборов — с помощью фланцевых соединений. Наконец, отметим исключительное многообразие возмущающих факторов, действие которых приводит в итоге к разгерметизации узлов, аппаратов и систем, работающих в асептических условиях. Например, вибрация аппаратов при работе перемешивающих устройств, крутящие моменты, возникающие при термической стерилизации и охлаждении систем трубопроводов, различная степень затяжки болтовых соединений фланцевых уплотнений и др. Важно иметь в виду, что возмущающие факторы, как правило, действуют в самых различных сочетаниях, а разнохарактерность их природы практически исключает возможность количественного описания процесса воздействия этих факторов и прогнозирования ожидаемого числа разгерметизаций [48].

Дегерметизация, как правило, приводит к поступлению целевых микроорганизмов или продуктов их жизнедеятельности в окружающую среду (например, в производственные помещения). Часто может наблюдаться и загрязнение культур посторонней микрофлорой. Однако в том и другом случае обнаружение единичных микроорганизмов с помощью существующих микробиологических (и других) методов контроля не представляется возможным. Поэтому мы полагаем, что герметизация аппаратов и коммуникаций должна гарантированно (с заданной вероятностью) исключать возможность попадания посторонней микрофлоры внутрь аппаратов и коммуникаций через различные неплотности. В то же время практика показывает, что дегерметизация возникает довольно часто, что требует тщательного изучения. Например, на основании анализа частоты разгерметизации монтажных схем ферментаторов (МСФ) вместимостью 2 м^3 отмечается, что явление дегерметизации наблюдается практически в каждом втором цикле ферментации [48, 49].

Данные о частоте разгерметизации аппаратов свидетельствуют о чрезвычайной изменчивости этого показателя, особенно при недостаточном объеме выборки, хотя и исчисляемой десятками и даже сотнями рабочих циклов аппаратов. Поэтому можно считать, что процессы разгерметизации носят вероятностный характер, и рассматривать дегерметизацию как случайное событие. Существенное увеличение объема выборки (более тысячи циклов работы ферментаторов) позволяет не только говорить о ее репрезентативности, но и рассматривать среднегодовую частоту разгерметизации как вероятность разгерметизации.

7.2. Некоторые элементы и узлы герметизации

Одним из наиболее распространенных герметизирующих элементов на микробиологических производствах является арматура, количество которой в монтажной схеме одного ферментатора может достигать нескольких десятков штук, а в современном цехе ферментации — нескольких тысяч штук. При бóльшей детализации рассмотрения герметизирующих элементов арматура представляется совокупностью более простых эле-

ментов, в числе которых уплотнение седло — клапан, уплотнение штока, фланцевые соединения, обеспечивающие подключение арматуры к трубопроводам и аппаратам.

Количественные характеристики эффективности герметизации [49], которыми обладают некоторые элементы монтажных схем ферментаторов вместимостью 2 м^3, показывают, что на долю арматуры приходится около 70% всех дегерметизаций. При этом в арматуре наиболее «слабым» элементом является уплотнение седло — клапан, на долю которого приходится более 80% всех дегерметизаций арматуры. Следует подчеркнуть, что в работах [48, 49] не приведены данные о частоте дегерметизации уплотнений валов мешалок аппаратов, мест вводов датчиков КИП в аппараты и др. Дальнейшее изучение и статистическая оценка фактов разгерметизации всех элементов монтажных схем аппаратов позволят конкретизировать наши знания о наиболее «слабых» элементах, требующих замены или резервирования.

В данном разделе мы не преследуем цель описать и проанализировать все многообразие конструкций герметизирующих элементов и узлов. Отметим лишь, что подавляющее большинство типовых элементов не в полной мере отвечает требованиям микробиологических производств. При этом одними из главных требований являются гарантированная стерилизуемость этих элементов и возможность оперативного контроля за эффективностью герметизации с помощью стандартных отечественных приборов. Создание герметизирующих элементов, отвечающих требованиям микробиологических производств, является одной из важных задач, решение которой будет способствовать дальнейшему росту культуры производства, достижению гарантированно асептических условий в аппаратах и коммуникациях.

Одним из важных направлений повышения эффективности герметизации является переход на сварные соединения вместо фланцевых. Однако в этом случае для проверки герметичности замков вентилей (седло — клапан) на трубопроводе необходимо монтировать бобышку с пробкой для щупа галоидного течеискателя. Хотя монтажом бобышки вводится в схему новый гер-

метизирующий элемент, в целом состояние герметичности не ухудшается, так как по размерам герметизирующей поверхности бобышка во много раз меньше фланцевого соединения и проверка на герметичность не составляет труда.

Другим направлением повышения эффективности герметизации монтажных схем могут быть разработка и внедрение в практику новых коллекторных устройств (рис. 25), учитывающих особенности микробиологических производств [53]. Требуемая эффективность достигается за счет совмещения корпусов трубопроводной арматуры, установленной на патрубках коллекторного устройства, с его трубой — коллектором и использования каждого присоединительного патрубка коллекторного узла в качестве седла под клапан-золотник шпиндельного узла стандартного вентиля. При таком совмещении труба — коллектор, по существу, превращается в единый общий корпус многоканального (многошпиндельного) вентиля, в котором для осуществления перекрытия присоединительных патрубков используются лишь крышки и шпиндельные узлы стандартной трубопроводной арматуры. В этом случае оказываются изъятыми все корпуса ранее использовавшейся трубопроводной арматуры, которые обладают значительной массой, громоздки, имеют сложную конфигурацию внутренней полости и труднодоступные для пара места, характеризуются большим гидравлическим сопротивлением и развитой поверхностью теплообмена.

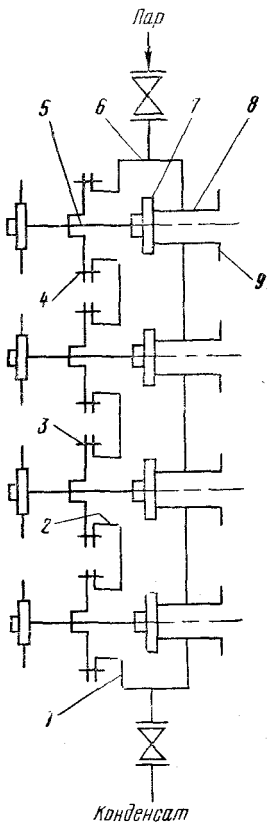


Рис. 25. Принципиальная схема коллекторного устройства для нужд микробиологических производств:

1 — корпус; *2*— патрубок; *3* — фланец; *4* — крышка; *5* — шпиндельный узел; *6* — заглушка; *7* — клапан; *8*— присоединительный патрубок; *9* — фланец.

Рассмотрим особенности и преимущества коллекторного устройства (рис. 25). Корпус устройства представляет собой трубу *1* с заглушками *6*. По длине корпуса с одной стороны расположены присоединительные патрубки *8* с фланцами *9* для присоединения трубопроводов, а с противоположной стороны — патрубки *2* с фланцами *3* для присоединения крышек *4* со шпиндельными узлами *5* стандартных вентилей. Торцевая часть патрубков *8*, расположенная внутри корпуса *1*, используется в качестве опорной, уплотнительной поверхности под клапаны-золотники *7*.

Коллекторное устройство работает следующим образом. Патрубки перекрываются с помощью клапанов-золотников *7*, которые под действием осевого усилия, передаваемого шпинделем, плотно прижимаются к уплотнительным поверхностям патрубков *8*. При открывании каналов клапаны-золотники *7* снимаются с уплотнительных поверхностей патрубков *8* и перемещаются в левое положение. В зависимости от назначения и условий работы коллекторного устройства подвод или отвод транспортируемой среды может осуществляться либо по одному из четырех каналов, либо одновременно по одной из шести возможных пар каналов, либо по четырем каналам сразу. Одним из каналов (патрубков) коллекторное устройство подсоединяется к аппарату. Для стерилизации устройства и подключенных к нему магистралей, а также для создания термического затвора к коллекторному устройству подключены в верхней точке пар, а в нижней — линия удаления конденсата.

Практика эксплуатации аппаратов, монтажные схемы которых включают рассмотренное коллекторное устройство, позволяет сделать некоторые выводы относительно его преимуществ и недостатков. Во-первых, в 2 раза сокращается количество запорной арматуры, непосредственно обеспечивающей работу ферментаторов в асептических условиях. Это приводит к уменьшению числа и других герметизирующих элементов (фланцевых соединений, замков, сильфонов или сальников вентилей) и, как следствие, обеспечивает повышение эффективности герметизации узлов и технических систем. Во-вторых, примерно в $2^1/_2$ раза снижается протяженность коммуникаций в монтажной схеме каждого аппа-

рата. Наконец, в 2 раза сокращается время ремонта при подготовке аппарата к рабочему циклу. Существенно уменьшается гидравлическое сопротивление коммуникаций, сокращается поверхность теплоотдачи при одновременном повышении эффективности термической стерилизации и снижении количества тепловыделений в производственные помещения.

Однако необходимо отметить, что создание коллекторных устройств не исчерпывает всего комплекса работ, направленных на совершенствование монтажных схем микробиологических производств. Они являются лишь одним из частных решений, полезность которого подтверждена практикой.

Как показывает практика работы микробиологических производств, одними из «слабых» элементов являются сильфоны запорной арматуры. Несмотря на то, что на их долю приходится около 3% общего количества отказов арматуры [49], именно их дегерметизация часто приводит к нестерильным операциям и браку в производстве, так как большей частью они разрушаются на коллекторных трубопроводах подачи стерильной питательной среды или других стерильных жидкостей в ферментаторы. В МСФ широко используют также другие устройства (торцевые уплотнения валов перемешивающих устройств ферментаторов, поршни дозировочных насосов и др.), в которых герметизирующим элементом служат сильфоны из нержавеющей стали.

В настоящее время возможно несколько направлений работ, имеющих целью увеличение эффективности герметизации с помощью сильфонов: повышение надежности узлов герметизации путем замены однослойных сильфонов на многослойные и создание устройств, обеспечивающих непрерывный автоматический контроль герметичности сильфонов и увеличение надежности последних.

Известно, что для повышения эффективности герметизации шпинделя и контроля за герметичностью сильфонной диафрагмы некоторые конструкции стандартных вентилей оснащены страхующим сальником и штуцером для присоединения датчика, с помощью которого фиксируется наличие транспортируемой среды, проникшей через разрушенный сильфон. Недостатком такой системы в случае разрушения сильфона является

возможность непосредственного контакта окружающей среды с транспортируемой жидкостью при неконтролируемой и нарушенной герметичности страхующего сальникового уплотнения (износ сальниковой набивки, слабая затяжка сальника и др.). При этом эффективность применения датчика, основное назначение которого заключается в предупреждении контакта транспортируемых через вентиль жидкостей или газов с окружающей средой, сводится к минимуму или к нулю, поскольку контакт с окружающей атмосферой или утечка через неконтролируемое негерметичное сальниковое уплотнение может происходить и после момента срабатывания датчика. Кроме того, такой способ контроля герметичности, основанный на чувствительности датчика к виду протекающих через вентиль различных сред (жидкость или газ) или к их конкретным свойствам (электропроводность, вязкость, химическая активность и др.), не является универсальным и требует установки датчиков, отличающихся по принципу действия и конструктивному устройству.

Известны конструкции нестандартных сильфонных вентилей, в которых страхующие сальниковые уплотнения шпинделя заменены сильфоном, дублирующим рабочий сильфон, непосредственно контактирующий с протекающим через вентиль газом или жидкостью. Такая замена при отсутствии непрерывного контроля за герметичностью дублирующего сильфона не освобождает эти конструкции вентилей от недостатков, присущих вентилям со страхующим сальником, поскольку из-за значительных колебаний долговечности сильфонов нет гарантии определенной последовательности их разрушения и не исключаются ситуации, когда дублирующий сильфон выйдет из строя раньше рабочего сильфона.

Необходимо подчеркнуть, что введение страхующих элементов в рассмотренные конструкции вентилей представляет собой технические меры по предупреждению контакта протекающих через вентиль жидкости или газа и не решает вопроса повышения долговечности рабочего сильфона.

Весьма полезным зарекомендовал себя на практике способ контроля герметичности узлов герметизации, в

которых в качестве разделительного элемента на границе разобщаемых сред используются подвижные сильфонные или мембранные диафрагмы в сочетании с дублирующими элементами [77]. Данный способ обеспечивает непрерывный и независимый от вида и физико-химических свойств изолируемой среды контроль герметичности рабочего и дублирующего сильфонов, повышает долговечность рабочего сильфона и снижает вероятность его разрушения (смятия) при резких изменениях давления. Сущность этого способа заключается в том, что внутри полости, ограниченной рабочим и дублирующим сильфонами (рис. 26), создается пневматическое давление, которое несколько выше рабочего давления изолируемой среды (протекающих через вентиль жидкостей или газов). Перепад давлений позволяет осуществлять одновременный и непосредственный контроль герметичности рабочего и дублирующего сильфонов путем фиксации момента нарушения их герметичности по снижению пневматического давления в полости, ограниченной этими сильфонами.

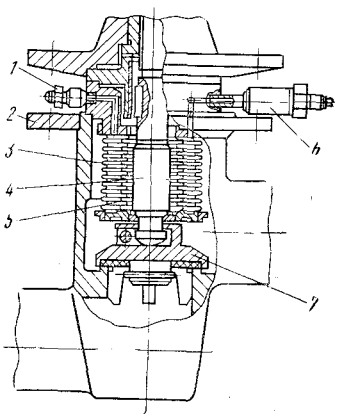


Рис. 26. Трубопроводный сильфонный вентиль:

1 — клапан ниппельный; *2* — корпус вентиля; *3* — рабочий сильфон; *4* — шпиндель; *5* — дублирующий сильфон; *6* — пневмоэлектрический датчик; *7* — клапан.

Указанный способ контроля герметичности позволяет использовать датчики, работающие только от давления, и поэтому является универсальным. Существенным его достоинством является и то, что благодаря создаваемому давлению рабочий сильфон, который по сравнению с дублирующим эксплуатируется в более тяжелых условиях (непосредственный контакт с изолируемой средой, воздействие температуры, давления и др.), оказывается разгруженным, поскольку давление изолируемой среды практически уравновешивается созданным внутри сильфонов пневматическим давлением. Разгрузка рабочего сильфона также увеличивает его долговеч-

ность и значительно уменьшает вероятность его разрушения (смятия) при резком изменении давления.

Для использования предлагаемого способа необходимо герметично подсоединить к штуцеру, внутренний канал которого сообщается с полостью, ограниченной рабочим и дублирующим сильфонами, какой-либо пневматический датчик (например, электроконтактный манометр) и через клапан одностороннего действия (например, ниппельный), соединенный с той же полостью, создать в ней требуемое пневматическое давление. Величина этого давления определяется в зависимости от условий эксплуатации герметизирующих устройств с учетом давления, температуры и других параметров изолируемой среды. Показанная на рис. 26 конструкция производственного образца сильфонного вентиля оснащена электроконтактным манометром и ниппельным клапаном. Особенностью конструкции вентиля является концентрическое (один в другом) расположение рабочего и дублирующего сильфонов.

7.3. Результаты экспериментальной оценки эффективности герметизации промышленных технических систем, узлов и элементов, работающих в асептических условиях

Количественная характеристика процессов разгерметизации возможна только на основе статистического анализа данных, накапливаемых в ходе эксплуатации промышленных технических систем микробиологических производств [48, 49]. Указанные системы должны работать как составная часть конкретного производственного корпуса или участка при проектной нагрузке. Именно в этом случае будет накапливаться информация, объективно отражающая специфику функционирования технических систем. Для каждого производства очень важно и прогнозирование ожидаемого количества разгерметизаций с целью своевременного создания запаса герметизирующих элементов в количестве, обеспечивающем нормальную работу производства. Эти сведения необходимы для планирования работы ремонтно-механических служб микробиологических предприятий.

В силу исключительного многообразия и разнородности причин, обусловливающих разгерметизацию различных элементов и узлов, саму разгерметизацию мы рассматриваем как случайное событие, количественной характеристикой которого является вероятность. Нами уже показана возможность использования закона Пуассона для прогнозирования количества разгерметизаций в монтажных схемах ферментаторов вместимостью 2 м³ [48, 49]. Приведены также результаты статистической оценки эффективности герметизации монтажных схем таких ферментаторов и входящих в их состав элементов. Рассмотрим эти вопросы применительно к монтажным схемам типовых промышленных ферментаторов вместимостью 50 м³. В объем выборки включены данные, полученные в течение 2 лет эксплуатации двух промышленных цехов ферментации *А* и *Б* (табл. 34).

Таблица 34. **Объем выборки и частота разгерметизации монтажных схем промышленных ферментаторов вместимостью 50 м³**

Год	Цех *А*			Цех *Б*			Два цеха		
	n	$n_р$	$n_р/n \cdot 100$, %	n	$n_р$	$n_р/n \cdot 100$, %	n	$n_р$	$n_р/n \cdot 100$, %
1-й	774	404	52,2	1027	648	63,4	1801	1052	58,3
2-й	982	936	95,5	1081	721	66,6	2063	1657	80,2
Два года	1756	1340	76,3	2108	1369	65,2	3864	2709	70,0

Примечание. n — общее число рабочих циклов ферментаторов, включенное в анализируемую выборку; $n_р$ — число циклов, в которых выявлено i разгерметизаций (i=1, 2, 3,...).

Данные табл. 34 показывают, что общий объем выборки составил 3864 рабочих цикла ферментаторов; в 2709 циклах наблюдалась разгерметизация. Вероятность разгерметизации 0,7, т. е. выше, чем у аппаратов вместимостью 2 м³ [48, 49].

Весьма интересны для практики данные об относительной частоте разгерметизации сильфонной арматуры, установленной на участках МСА, работающих в асептических условиях (табл. 35).

Таким образом, в монтажных схемах ферментаторов вместимостью 50 м³ на арматуру приходится 50%

Таблица 35. **Относительная частота разгерметизации сильфонной арматуры**

Показатель	Цех *А*	Цех *Б*	Два цеха
Всего разгерметизаций (R)	1350	1364	2714
Число разгерметизаций сильфонной арматуры ($R_а$)	688	688	1376
$R_а/R \cdot 100$, %	50,8	50,4	50,6

всех разгерметизаций, т. е. несколько меньше, чем в ферментаторах вместимостью 2 м³ [122, 123]. Исключительно важно для практики выявление «слабых» элементов самой арматуры; некоторые результаты представлены в табл. 36. Самым «слабым» является уплот-

Таблица 36. **Относительная частота разгерметизации основных элементов сильфонной арматуры**

Элемент	Цех *А*				Цех *Б*				Два цеха			
	1-й год		2-й год		1-й год		2-й год		1-й год		2-й год	
	число	%	число	%	число	%	число	%	число	%	число	%
Седло — клапан	265	69,5	231	45,0	225	51,0	261	48,7	490	59,7	492	47,0
Сильфон	67	17,5	86	16,8	68	15,5	82	15,1	135	16,4	168	16,0
Крышка корпуса	7	1,7	32	6,2	17	3,9	33	6,0	24	2,9	65	6,0
Фланцевые соединения	43	11,3	164	32,0	130	29,6	162	30,2	173	21,0	326	31,0

нение седло — клапан, на долю которого приходится около 50% всех разгерметизаций. Эта величина незначительно отличается от полученной для ферментаторов вместимостью 2 м³. Достаточно высока и относительная частота разгерметизации фланцевых соединений, а также сильфонов. Эти данные объективно отражают действительную эффективность герметизации различных элементов, поскольку получены на значительном объеме выборки (1376 случаев) разгерметизации арматуры.

7.4. Пути повышения эффективности герметизации технических систем

В целом результаты статистической оценки эффективности герметизации МСФ указывают на значимость явления разгерметизации и необходимость совершенствования практически всех герметизирующих элементов, и в первую очередь арматуры, на долю которой приходится около 50% всех случаев разгерметизации.

Необходимо разработать новую арматуру, в полной мере отвечающую требованиям микробиологических производств. Особое внимание следует обратить на уплотнение седло — клапан, герметичность которого должна быть гарантированной и контролируемой. Переход на приварную арматуру исключит значительное число фланцевых соединений, однако не решит вопроса повышения эффективности герметизации штока. Применение многослойных сильфонов с контролируемой герметичностью, по-видимому, должно стать первым шагом в этом направлении.

Необходимо снижать и удельную поверхность, особенно арматуры малых диаметров, что повысит эффективность стерилизации и устранит «слабые» точки, характерные для типовых вентилей. Целесообразно создание торцевых уплотнений с контролируемой герметичностью, и в первую очередь для валов перемешивающих устройств ферментаторов, а также других аппаратов, работающих в гарантированно асептических условиях.

С позиций принципа равной эффективности должны быть оценены все герметизирующие элементы. Для этого необходимы накопление и анализ статистических данных о работе этих элементов в условиях, объективно отражающих специфику микробиологических производств. Наконец, требуется создание теории герметизации сложных систем, работающих в асептических условиях и подвергающихся одновременному воздействию различных возмущающих факторов.

8. ОТБОР ПРОБ ИЗ АППАРАТОВ

8.1. Особенности отбора проб

Отбор проб широко распространен как в микробиологических научно-исследовательских лабораториях, так и на всех без исключения микробиологических про-

изводствах. В то же время при передаче материалов (при отборе проб среды из аппаратов до посева, при отборе проб культуральной жидкости, при внесении в аппарат посевного материала и добавок в малых количествах) производится разгерметизация основного технологического оборудования (ферментаторы, посевные аппараты, емкости с растворами сахаров, пеногасителями и др.). При этом могут произойти обсеменение посторонней микрофлорой передаваемых материалов и загрязнение содержимого аппаратов. В первом случае при отборе проб и анализе чистоты содержимого аппаратов может быть дано ложное заключение о его «загрязнении» и, как следствие, принято необоснованное решение об уничтожении высококачественных продуктов. Во втором случае контаминация культуральной жидкости необратимо приводит к браку и значительным потерям продукции.

При наличии контакта с окружающей атмосферой передаваемых из аппарата или в аппарат материалов последние могут обсеменять промышленными микроорганизмами окружающую атмосферу и тем самым ухудшать санитарно-гигиенические условия на рабочих местах. Операции передачи материалов в течение одного цикла выращивания культуры осуществляются многократно, что способствует повышению вероятности контаминации содержимого аппаратов. Передачу материала можно рассматривать как несколько последовательно осуществляемых процессов: подключение стерильного пробоотборного сосуда с добавкой к аппарату (устройству для передачи материала); стерилизация устройства для передачи материала до и после подключения к аппарату сосудов; передача материала; отключение сосудов от аппарата; стерилизация устройств для передачи материала до или после отключения сосудов от аппарата.

Практическая реализация процессов отбора проб или дискретного введения добавок в малых количествах должна отвечать определенным требованиям. Необходимо, чтобы количество и характеристики отобранного материала обеспечивали возможность объективной оценки свойств материала в аппарате. Следует исключить влияние условий отбора проб на изменение свойств материала. При этом гарантированно (с задан-

ной вероятностью) нужно обеспечивать требования асептики в отношении как защиты от посторонней микрофлоры пробы и аппарата, так и защиты внешней среды. Технические устройства должны легко подключаться к аппаратам и отключаться от них, гарантированно стерилизоваться с помощью острого пара при режимах, характерных для стерилизации монтажных схем. Желательно, чтобы действительно достигаемый режим стерилизации мог объективно фиксироваться с помощью КИП. Необходима гарантированная стерильность воздуха, подсасываемого в пробоотборное устройство или удаляемого из него. Требуется возможность легкого контроля за герметичностью пробоотборного устройства.

Для выполнения указанных требований конструкция устройства для передачи материала должна обеспечить: герметичность подключения сосуда для пробы и сохранение герметичности в течение необходимого времени для исключения контакта передаваемого материала с окружающей средой и обсеменения посторонней микрофлорой материала, окружающей среды и внутренних поверхностей устройства; возможность создания давления и температуры пара при стерилизации внутренних полостей устройства для передачи материала во избежание загрязнения передаваемого материала и содержимого аппарата и сосудов, а также для обеспечения чистоты полостей устройства перед отключением сосудов; возможность удаления образовавшегося при стерилизации конденсата и первых порций отбираемых проб в герметичный коллектор для предотвращения выброса в окружающую атмосферу части передаваемого материала и пара при стерилизации.

8.2. Существующие методы и технические устройства

В настоящее время в микробиологической, медицинской, фармацевтической и других отраслях промышленности широко применяют «открытый» способ отбора проб технологических жидкостей и внесения добавок в малых количествах. Устройство для передачи материала при отборе проб показано на рис. 27. Оно состоит из сообщающегося через запорный вентиль *6* с внутренней

полостью аппарата *7* отборного трубопровода *4,* по которому отбираемая жидкость в пламени факела *3* передается в приемный сосуд для пробы *2,* и паропровода *5,* соединенного через запорный вентиль с трубопроводом 4 [160].

Известны также устройства для отбора проб, в которых сосуды для приема пробы соединяются с отборным трубопроводом через промежуточные камеры, оснащенные приборами контроля и различными устройствами, например для охлаждения отбираемой жидкости, если она имеет повышенную температуру[1]. Это устройство (рис. 28) состоит из отборного трубопрово-

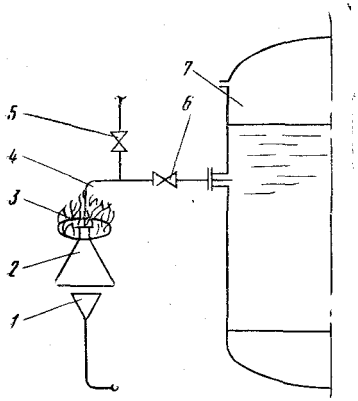


Рис. 27. Устройство отбора проб технологических жидкостей:

1 — воронка удаления конденсата; *2* — приемный сосуд; *3* — факел; *4* — отборный трубопровод; *5* — паропровод; *6* — вентиль на материальной линии; *7* — аппарат.

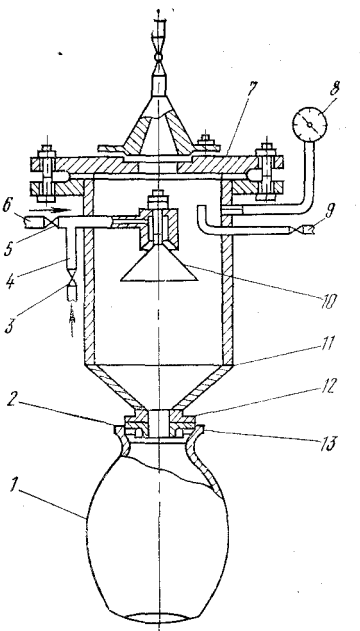


Рис. 28. Устройство отбора проб с охлаждением.

да *6,* сообщающегося через запорный вентиль *5* с аппаратом, из которого отбирается проба жидкости; паропровода *4,* соединенного через запорный вентиль *3* с трубопроводом *6*; промежуточной камеры *11,* соеди-

[1] А. С. 265556 (СССР). — Б. И., 1970, № 10.

ненной с проходящим в ее внутреннюю полость трубопроводом *6*, на конце которого установлена конусная распылительная насадка *10*; приемного стеклянного сосуда *1*, закатанного крышкой *2* с припаянной к ней гайкой *13*. Промежуточная камера представляет собой цилиндрический сосуд с крышкой *7* и коническим днищем, которое заканчивается сливным резьбовым штуцером *12* для присоединения приемного сосуда. На крышке имеется бактериологический фильтр. Внутренняя полость камеры сообщается с вакуумной линией *9* и мановакуумметром *8*.

Пробоотборники с вытяжкой, которыми снабжены имеющиеся в продаже лабораторные ферментаторы, получили широкое распространение благодаря безопасности и простоте их употребления для стерильного отбора проб культур. Проба берется путем сжатия резиновой груши для удаления воздуха из трубки и последующего ее ослабления, приводящего к поступлению пробы в трубку под вакуумом. Сосуд, в который поступает через трубку проба, передают на анализ и заменяют другим стерильным сосудом. Во время замены некоторое количество нестерильного воздуха может попасть в новый сосуд. Воздух попадает затем в ферментатор при получении следующей пробы, что может привести к загрязнению культуральной среды. Однако, если отвести нестерильный воздух из сосуда до его проникновения в ферментатор, можно избежать загрязнения. С помощью стандартного пробоотборника с вытяжкой [112] можно неоднократно отбирать пробы с очень незначительной вероятностью загрязнения.

Опубликованы описания конструкций самых различных пробоотборных устройств, однако ни одно из них в полной мере не отвечает требованиям ведения процессов в гарантированно асептических условиях, исключающих возможность поступления даже одной посторонней клетки в стерильные полости. По своим характеристикам и условиям обработки пробоотборное устройство должно являться неотъемлемой частью аппарата (ферментатора), такой же герметичной и стерилизуемой, как и сам аппарат. Совместно с Г. Е. Скворцовым, А. В. Эйромджанцем и А. Т. Якимовым мы разработали и опробовали в производственных условиях устройство для передачи материала в асептических ус-

ловиях [54, 56]. Оно обеспечивает требования, предъявляемые к процессам отбора проб или введения добавок в малых количествах (рис. 29).

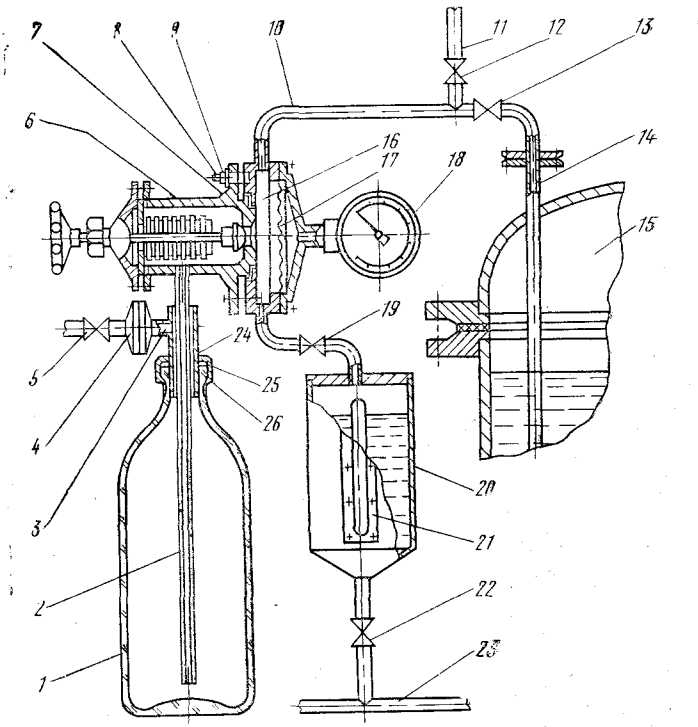


Рис. 29. Пробоотборное устройство для герметичного отбора проб.

Устройство имеет промежуточную камеру *16*, верхняя часть корпуса которой соединена с помощью отборного трубопровода *10*, запорного сильфонного вентиля *13* и трубы передавливания *14* с внутренней полостью емкостного аппарата *15*. Из этого аппарата отбирается проба жидкости. К отборному трубопроводу *10* присоединен через вентиль *12* паровой трубопровод *11* (в корпус вентиля *13*). Нижняя часть корпуса камеры *16* соединена через запорный сильфонный вентиль *19* с конденсатосборником *20*, который оснащен указателем уровня *21* и соединен через запорный сильфонный

вентиль *22* с магистральным трубопроводом *23* удаления загрязненного конденсата.

Для ликвидации тупиковых мест, труднодоступных для стерилизующего пара, мановакуумметр *18* присоединен к промежуточной камере *16* через мембранный разделитель *17*, металлическая диафрагма которого, отделяя рабочую полость мановакуумметра от внутренней полости промежуточной камеры, является одновременно задней стенкой ее корпуса. На горловине приемного сосуда *1* через прокладку *25* герметично установлена крышка *26*, в центральной части которой имеется патрубок *3* с помещенным на нем бактериологическим фильтром *4* и краном *5*. Через донную часть стакана *24* внутрь приемного сосуда *1* проходит сифонная трубка *2*, на верхнем конце которой установлен сильфонный вентиль *6*, герметично присоединяемый через прокладку *7* к промежуточной камере *16* с помощью шпилек *8* и нажимных гаек *9*. Сифонная трубка *2* позволяет производить под действием избыточного давления воздуха, подаваемого через кран *5* и бактериологический фильтр *4*, передавливание стерильной жидкости из сосуда *1* в емкостный аппарат *15* или другие емкости и сосуды при обработке пробы в лаборатории.

Передача материала осуществляется следующим образом. С помощью шпилек *8*, нажимных гаек *9* и присоединительного фланца вентиля предварительно простерилизованный в автоклаве приемный сосуд *1* через прокладку *7* герметично присоединяют к промежуточной камере *16*. При стерилизации в автоклаве и присоединении сосуда *1* к промежуточной камере *16* стационарно установленный на его горловине вентиль *6* находится в закрытом положении, а кран *5* — в открытом. Затем при закрытом вентиле *13* и открытом вентиле *12* внутренние полости трубопровода *10*, камеры *16*, вентиля *19*, конденсатосборника *20*, вентиля *22* и поверхности корпуса вентиля *6*, контактирующие с внутренней полостью промежуточной камеры *16*, стерилизуются острым водяным паром, поступающим по трубопроводу *11*, в течение заданного промежутка времени. Сначала подача стерилизующего пара производится при закрытом вентиле *22*. Затем при попеременном закрывании и открывании вентилей *19* и *22* обра-

зующийся конденсат из конденсатосборника *20* удаляется в магистральный трубопровод *23*. Количество конденсата в конденсатосборнике *20* контролируют по указателю уровня *21*. Прямой контроль за удалением пара и косвенный контроль за температурой нагрева осуществляют по показаниям мановакуумметра *18*.

По истечении времени выдержки подачу стерилизующего пара прекращают перекрытием парового трубопровода *11* вентилем *12*. После закрывания вентиля *12* и прекращения подачи пара производят контролируемое по мановакуумметру *18* снижение давления в промежуточной камере *16* до атмосферного путем удаления оставшегося пара в трубопровод *23* «грязного» конденсата.

До отбора пробы для исключения попадания в приемный сосуд *1* застоявшейся порции жидкости в трубе передавливания *14* и охлаждения его горячих от стерилизации стенок промежуточной камеры *16* эту жидкость удаляют в конденсатосборник *20*. Для этого при закрытых вентилях *12*, *22* и *6* последовательно открывают вентили *13* и *19* и по указателю уровня *21* контролируют количество жидкости, поступающей в конденсатосборник *20*. По достижении верхнего уровня поступление жидкости в конденсатосборник *20* прекращают закрыванием вентиля *19*. Для отбора свежей порции жидкости в приемный сосуд *1* открывают вентиль *6*, а при наполнении его до требуемого уровня закрывают вентили *6* и *13*.

Используя устройство для передачи материала в аппарат, при подключенном сосуде *1* открывают вентили *13* и *6* при закрытых вентилях *12*, *19* и *22*; в сосуде *1* создается давление через кран *5* и фильтр *4* несколько больше, чем в аппарате, и содержимое передавливается в аппарат. После передачи материала для предотвращения выброса остатка передаваемой жидкости из промежуточной камеры *16* и исключения контакта этой жидкости с атмосферой производственного помещения вторично стерилизуют внутреннюю полость устройства. Для этого при закрытых вентилях *13*, *22* и *6* последовательно открывают вентили *19* и *12*. После наполнения конденсатосборника *20* пароконденсатной смесью с остатками передаваемой жидкости вентиль *19* закрывают, а вентиль *22* на короткое время

открывают, благодаря чему жидкость из конденсатосборника *20* сбрасывается в магистральный трубопровод *23* «грязного» конденсата.

Последующие операции по стерилизации устройства аналогичны операциям, проводившимся при стерилизации устройства до передачи материала.

По окончании вторичной стерилизации после снижения давления в промежуточной камере *16* до атмосферного при закрытых вентилях *13*, *12*, *19* и *6* сосуд *1* с вентилем *6* отсоединяют от промежуточной камеры *16*. На этом процесс передачи материала заканчивается, однако для уменьшения времени контакта внутренней полости промежуточной камеры *16* с окружающим воздухом целесообразно сразу установить новый приемный сосуд *1*.

Описанное устройство обеспечивает выполнение требований, предъявляемых к процессам передачи материала.

Передача материала производится по герметичному материалопроводу, и материал не имеет контакта с окружающей атмосферой. Поэтому не может быть загрязнения ни материала, ни устройства, ни содержимого аппаратов посторонней микрофлорой. До отбора пробы и после отбора пробы устройство стерилизуют, при этом поддерживаются оптимальные значения давления и температуры пара в промежуточной камере. Отсутствие в устройстве тупиковых мест и контроль параметров пара обеспечивают эффективную стерилизацию, сокращают ее продолжительность. Отсутствие посторонней микрофлоры в устройстве в период передачи материала обеспечивает сохранение высокого качества содержимого аппаратов, передаваемых материалов и сосудов.

Исключен свободный выход из устройства пароконденсатной смеси и передаваемого материала в окружающую среду, что более полно удовлетворяет требованиям по технике безопасности и санитарно-гигиеническим требованиям. Высокая гарантия получения объективной информации о состоянии технологического процесса значительно сокращает вероятность ложного заключения о браке производимой продукции, позволяет повысить производительность промышленного оборудования.

С целью определения эффективности стерилизации предлагаемого устройства мы изучили температурные поля его внутренних полостей. Для измерения температуры в полости устройства были установлены хромель-копелевые термометры (см. рис. 29), в полость вентиля *13* — термопара *1*, в промежуточную камеру *16* в непосредственной близости около клапана вентиля *6* — термопара *2*, в полость вентиля *19* — термопара *3*, в полость патрубка между конденсато-сборником *20* и вентилем *22* — термопара *4*. Нагревание производили по указанной выше последовательности выполнения операций.

Оказалось, что во всех контролируемых точках полости устройства максимальная температура достигается в течение 1 мин. При этом патрубок между сборником конденсата *20* и вентилем *22* не нагревается до необходимой для стерилизации температуры (76—115° С). Температура в этой точке повышается до 130° С в тот период, когда закрывается вентиль *19* и открывается вентиль *22* для удаления конденсата. Поскольку эта термопара находится в самой нижней части полости устройства, то в период его стерилизации здесь скапливается конденсат. После слива конденсата из конденсатосборника *20* идет пар, температура в этот момент поднимается до 130° С. Однако установленный факт недостаточной стерилизуемости этой точки не влияет на чистоту передаваемых материалов, так как отбор проб и внесение добавок производят при закрытом вентиле *19*.

Для количественной оценки эффективности стерилизации устройства были рассчитаны по экспериментальным данным значения критерия стерилизации для разных режимов. При достижении в контролируемых точках в течение 1 мин максимальной температуры 139° С критерий стерилизации составил 12,0. Для обеспечения стерильности при этой температуре достаточно выдержки 0,2 мин. Учитывая возможность присутствия в трубопроводах твердых частиц диаметром 2 мм, для которых время нагревания согласно расчету составит около 4 мин, можно рекомендовать следующий режим стерилизации пробоотборного устройства: нагревание 1 мин, выдержка 3 мин, охлаждение. При этом режиме критерий стерилизации для полости равен 386,

для твердых частиц — 48,3. Критерием стерилизации периода охлаждения можно пренебречь, так как давление в пробоотборном устройстве снижается за время менее 0,5 мин.

Важно отметить, что конструкция пробоотборного устройства позволяет достигать в его внутренней полости практически той же температуры, что и в обечайке основного аппарата. При иных параметрах греющего пара (температура и давление) всегда легко скорректировать время выдержки, обеспечивающее достижение требуемого значения критерия стерилизации. Отсутствие в конструкции пробоотборного устройства «слабых» точек позволяет косвенно оценивать достигаемую при стерилизации температуру по показателям мановакуумметра.

Стерилизуемость устройства передачи материала по рекомендуемому режиму и чистота проб подтверждены исследованиями в лаборатории и на производстве.

Пробы предварительно простерилизованной питательной среды анализировали на наличие в них посторонней микрофлоры после выдержки в термостате в течение 72 ч. Контролем служили пробы, отобранные обычно принятым способом. Из 100 в 79 пробах получили неправильный результат: при наличии в аппарате стерильной среды пробы были заражены в момент отбора. Обсемененность окружающей атмосферы посторонней микрофлорой в период отбора проб достигала $1{,}5—7 \cdot 10^3$ клеток в 1 мл. Все пробы, отобранные с помощью предложенного устройства, оказались стерильными. При отборе из аппарата культуральной жидкости согласно методике перед отбором пробы в приемный сосуд *1* первая порция жидкости из трубы передавливания *14* через промежуточную камеру *16* сливалась в конденсатосборник. При этом пробоотборное устройство охлаждалось до температуры, равной рабочей температуре в аппарате *15*.

8.3. Пути совершенствования методов и устройств для отбора проб

По-видимому, с теоретической точки зрения идеальным является пробоотборное устройство с анализатором, которые в сочетании обеспечивают подачу пробы, оценку требуемых параметров и возврат жидкости в аппарат

при выполнении требований асептики. При анализе культуральной жидкости такая система должна функционировать как неотъемлемая часть ферментатора, стерилизуемая совместно с ним и гарантированно исключающая контакт анализируемой пробы с окружающей средой. Однако создание таких устройств для промышленных аппаратов неизбежно встречает ряд трудностей.

Усложняющиеся процессы ферментации требуют контроля все большего числа параметров и показателей. Многие показатели должны сниматься регулярно для того, чтобы операторы могли вовремя вмешаться в процесс. Таким образом, необходимы, с одной стороны, все более сложные анализаторы, все большей стоимости. С другой стороны, установка сложных приборов на каждый ферментатор не представляется достаточно экономичной. Кроме того, регулярная обработка производственных помещений различными деконтаминантами может привести к быстрому выходу из строя сложных анализаторов.

Очевидно, что сам подход к решению вопроса об организации контроля за качеством процесса должен несколько отличаться применительно к исследовательским и промышленным ферментаторам. В первом случае необходимо максимальное количество информации с целью более глубокого объективного изучения процесса и надежной отработки режимов. Во втором представляется целесообразным получение информации о надежности созданных устройств в реальных условиях микробиологических производств. По нашему мнению, вопрос о том или ином типе пробоотборника нужно решать в каждом конкретном случае с учетом как технологических, так и экономических факторов.

9. ДОЗИРОВАННАЯ ПОДАЧА СТЕРИЛЬНЫХ ЖИДКОСТЕЙ И ЧИСТЫХ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ

9.1. Дозирование жидкостей в асептических условиях — специфический процесс микробиологических производств

В настоящее время для промышленного микробиологического синтеза, осуществляемого в аппаратах периодического и непрерывного действия, характерно все бо-

лее широкое использование технических устройств и систем, предназначенных для дозированного введения различных стерильных жидкостей и чистых культур микроорганизмов. Это обусловлено стремлением, с одной стороны, обеспечить большую стабильность поддержания параметров, определяющих состояние развивающихся культур микроорганизмов и их конечные характеристики, а с другой, исключить необходимость вмешательства операторов в процесс, доверив эту функцию автоматизированным системам регулирования и управления.

Отмечается, что для большого класса микроорганизмов — продуцентов антибиотиков в практику все шире внедряются способы ферментации с непрерывным дозированием легкоокисляемых углеводов [26]. Однократная подача углеводов или даже подача раздельными порциями не обеспечивает достаточной скорости биосинтеза антибиотика (по сравнению с непрерывной подачей). Поскольку скорость подачи углеводов влияет на такой технологический параметр, как их концентрация в среде, естественно при изучении физиологии микроорганизмов находить зависимость между этим параметром и скоростью биосинтеза антибиотика. В реальных условиях, возникающих при непрерывном дозировании углеводов в ходе процесса, скорость их потребления настолько высока, что, несмотря на непрерывную подачу, в среде культивирования обнаруживают лишь следы углеводов. В то же время связь между скоростью дозирования углеводов и их концентрацией в среде неоднозначна и определяется концентрацией биомассы, ее возрастом, величиной pH и др. На примере пенициллина показано, что на продуктивность влияют микроконцентрации глюкозы в среде. Для роста характерна зависимость от концентрации глюкозы в виде кривой с насыщением. Продуктивность мицелия снижается при увеличении концентрации глюкозы. Аналогичные данные применительно к процессу культивирования имеются не только по антибиотикам, но и по другим продуктам микробиологических производств. Во всех случаях использование дозированной подачи различных веществ обусловлено стремлением к повышению производительности стадии ферментации.

Процесс, при котором в популяцию микроорганизмов непрерывно подаются питательные вещества без удале-

ния клеток, можно назвать циклически питаемым процессом культивирования. В определенных условиях получаемые культуры имеют характеристики, сходные с характеристиками культур, растущих в хемостате. Наиболее существенное сходство между двумя системами состоит в том, что удельная скорость роста клеток может регулироваться объемной скоростью подачи питательных веществ в ферментатор. В обеих системах, как правило, имеется один компонент питательной смеси, концентрация которого в среде определяет скорость роста. Другие компоненты могут присутствовать в количествах либо превышающих потребности клеток, либо субоптимальных, т. е. ниже такого значения, при котором один из компонентов становится фактором, почти ограничивающим рост. В хемостате в режиме установившегося состояния таким фактором является скорость разведения, которая регулирует концентрацию лимитирующего рост питательного вещества в среде, окружающей клетки. Таким образом, в хемостате численное значение удельной скорости роста определяется двумя величинами, не зависящими от общего количества клеток в сосуде для культивирования. Однако в некоторых ситуациях это положение справедливо и для циклически питаемых культур.

Предложены уравнения, устанавливающие связь между скоростью потока раствора питательных веществ и удельной скоростью роста микробов в циклически питаемой культуре [125]. Эти уравнения иллюстрируют основные свойства такого типа культивирования и демонстрируют возможные пути и условия проведения аналогии между ним и непрерывным культивированием. Различают три основных типа циклически питаемых культур: 1) культура, в которой удельная скорость роста микробов не меняется со временем; 2) культура, в которой скорость потока питательных веществ является функцией времени; 3) культура, в которой скорость потока питательных веществ постоянна.

В практических условиях возможны многочисленные вариации в режиме работы циклически питаемых культур. Например, непрерывная или периодическая подача питательных веществ: после определенного периода времени могут быть удалены либо клетки, либо использованная среда, а затем процесс выращивания можно по-

вторить или расширить. В работе [125] рассмотрены только непрерывно питаемые системы, при культивировании которых удаление клеток или жидкостей до окончания периода роста не производится. Выведенные уравнения соответствуют идеализированному состоянию микробного роста, во время которого выход клеток, рассчитанный по одному лимитирующему рост питательному веществу, остается постоянным. Поэтому предполагают, что все клетки находятся в состоянии сбалансированного роста, репликация клеток носит асинхронный характер, клеточный метаболизм не зависит непосредственно от возраста культуры и влиянием условий для поддержания роста можно пренебречь. Полагают, что увеличение объема среды в культуральном сосуде равно объему подаваемого питательного раствора.

Постоянная удельная скорость роста. Из уравнения экспоненциального роста микроорганизмов следует, что

$$X_д = X_0 [\exp(\mu\tau) - 1], \qquad (176)$$

где $X_д$ — количество клеток в момент времени $\tau \neq 0$; X_0 — то же в момент времени $\tau = 0$; μ — коэффициент скорости роста; τ — время.

Кроме того,

$$X_д = V_f S_Y Y_Y, \qquad (177)$$

где V_f — объем подаваемого в культуральный сосуд питательного раствора; S_Y — концентрация подаваемого лимитирующего рост питательного вещества; Y_Y — коэффициент выхода.

Комбинируя уравнения [176] и [177], получают:

$$V_f = \frac{X_0}{S_Y Y_Y} - [\exp(\mu\tau) - 1] \qquad (178)$$

или

$$V_f = K_V [\exp(\mu\tau) - 1], \qquad (179)$$

где значение K_V, которое называют «константой объема», представляет собой результирующий фактор, равный количеству клеток в момент времени $\tau = 0$, деленному на произведение коэффициента выхода и концентрации лимитирующего рост питательного вещества в подаваемой среде.

Зависимость между скоростью потока питательного вещества и удельной скоростью роста получают путем дифференцирования по времени:

$$F_{\text{п}} = \mu \exp(\mu\tau) K_V, \tag{180}$$

$$F_{\text{п}} = \frac{dV_f}{d\tau}. \tag{181}$$

Постоянная скорость изменения потока. Мгновенное значение скорости подачи питания выражается следующим уравнением:

$$F = F_0 + g\tau, \tag{182}$$

где F_0 — скорость потока лимитирующего рост питательного вещества при подаче в нулевое время; g — скорость изменения величины потока во времени.

Отсюда

$$V_f = \int_0^{\tau} F d\tau = \int_0^{\tau} (F_0 + g\tau)\, d\tau. \tag{183}$$

Следовательно,

$$V_f = F_0\tau + 1/2\, g\tau^2. \tag{184}$$

Количество клеток выражается уравнением

$$X = X_0 + X_{\text{д}}. \tag{185}$$

Комбинируя уравнения (177) и (185), получаем:

$$X = X_0 + S_\gamma Y_\gamma V_f. \tag{186}$$

Подставляя значение V_f из уравнения (184), получаем:

$$X = X_0 + S_\gamma Y_\gamma (F_0\tau + 1/2 g\tau^2). \tag{187}$$

Находим значение S_γ из уравнения

$$K_V = \frac{X_0}{S_\gamma Y_\gamma}$$

и подставляем его в уравнение (187):

$$X = X_0 \left[1 + \frac{1}{K_V} (F_0\tau + 1/2 g\tau^2)\right]. \tag{188}$$

Скорость изменения количества клеток во времени:

$$\frac{dX}{d\tau} = \frac{X_0}{K_V} (F_0 + g\tau). \tag{189}$$

Значение μ в любой момент времени:

$$\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{d\tau}. \tag{190}$$

Из уравнений (188) и (189)

$$\mu = \frac{F_0 + g\tau}{K_V + \tau (F_0 + 1/2 g\tau)}. \tag{191}$$

Допуская, что подача питания является единственным фактором, влияющим на объем жидкости в культуральном сосуде, получаем:

$$V = V_0 + \int_0^{\tau} (F_0 + g\tau)\, d\tau. \qquad (192)$$

Следовательно,

$$V = V_0 + F_0\tau + 1/2g\tau^2. \qquad (193)$$

Постоянная скорость подачи питания. Когда скорость подачи питания поддерживается постоянной, значение g равно нулю и уравнение (191) приводится к следующему виду:

$$\mu = F_0/(K_V + F_0\tau). \qquad (194)$$

При $\tau = 0$ уравнения (191) и (194) становятся идентичными:

$$\mu = F_0/K_V. \qquad (195)$$

Аналогичным образом, приравнивая значение g к нулю, из уравнения (188) можно получить выражения для X и V.

Сравнение уравнений (176) и (178) показывает, что в случае циклически питаемого процесса с постоянной скоростью роста при определенных условиях концентрация клеток может поддерживаться постоянной. Это условие ограничивается тем, что константа объема K_V должна быть равна по величине объему жидкости в сосуде в нулевое время. То, что аналогичная ситуация имеет место при процессах, в которых скорость роста варьирует в зависимости от времени, подтверждается при сравнении уравнений (187) и (193).

Когда величина K_V равна V_0 и скорость подачи питания постоянна, удельная скорость роста клеток в циклически питаемых культурах должна быть равна F/V — скорости разведения в сосуде для культивирования. Это заслуживающее внимания условие получило название квази-установившегося состояния. Еще одно интересное состояние наблюдается, когда скорость экспоненциальной подачи определяется уравнением (180) и K_V равна V_0. В этом состоянии процесс культивирования с циклической подачей питания может осуществляться в течение какого-то периода времени с постоянными концентрацией клеток и удельной скоростью роста. Отме-

тим, что предварительным условием для проведения любой достаточно близкой аналогии между циклически и постоянно питаемыми культурами должно быть равенство значений K_V и V_0. Однако процесс культивирования с циклической подачей питания необязательно проводить таким путем. Например, K_V может быть меньше значения V_0. Это возможно при подаче концентрированных питательных сред со сравнительно низкой скоростью в относительно большой объем содержимого в сосуде.

В табл. 37 приведены суммарные данные временной зависимости трех факторов, касающихся размножения

Таблица 37. **Некоторые характеристики циклически питаемых процессов**

Скорость потока питательных веществ, определяемая уравнениями	Ограничение	Факторы, не изменяющиеся во времени	Факторы, зависящие от времени
$F_п=\mu K_V \exp(\mu\tau)$	$K_V \neq V_0$	μ	$dX/d\tau$, X
	$K_V = V_0$	μ, X	$dX/d\tau$
$F_п = F_0 + g\tau$	$K_V \neq V_0$	—	$dX/d\tau$, μ, X
	$K_V = V_0$	X	$dX/d\tau$, μ
$F_п = F_0$ (постоянная скорость потока)	$K_V \neq V_0$	$dX/d\tau$	μ, X
	$K_V = V_0$	$dX/d\tau$, X	μ

клеток: удельной скорости роста μ; скорости продуцирования клеток $dX/d\tau$ и концентрации клеток X. Очевидно, что три основных типа циклически питаемого процесса: с повышающейся (экспоненциальной) скоростью подачи питательных веществ, с повышающейся (линейной) скоростью подачи питательных веществ и с постоянной скоростью подачи — обладают определенными свойствами. При процессе 1-го типа постоянна удельная скорость роста, а при процессе 3-го типа постоянна скорость продуцирования клеток. Исходя из равенства или неравенства K_V и V_0, можно судить, является ли концентрация клеток постоянной или нет при любом из трех типов процесса.

Для циклически питаемых процессов указанного выше типа характерны две особенности: 1) количество биомассы в ферментерах возрастает со временем; 2) постоянные удельная скорость микробного роста и продуктивности

цирование клеток являются взаимоисключающими. В этих пределах существуют весьма разнообразные условия, при которых может осуществляться выращивание микроорганизмов в циклически питаемых культурах. Возможность широкого использования этого метода культивирования иллюстрируется примерами, представленными в табл. 37. Несомненно, подобная универсальность является одним из основных факторов, определяющих использование циклически питаемых культур во многих производственных процессах.

Показано, что скорость роста и концентрация подаваемого субстрата влияют на качество продукта, выходящего из хемостатов, которые содержат бактерии в чистой и смешанной культуре [115]. Таким образом, наметилось еще одно направление активного влияния на качество продукта с помощью непрерывного поддержания требуемой концентрации субстрата в культуральной жидкости. Решение этой задачи невозможно без использования дозирующих устройств.

При направленном биосинтезе одним из наиболее эффективных способов регулирования процесса является введение предшественников (процессы получения пенициллина и витамина B_{12}) [6]. Доказана целесообразность введения предшественников в среду для ферментации новобиоцина. Исключительно важным является тот факт, что условия накопления антибиотика могут коренным образом отличаться от условий культивирования, при которых происходит накопление биомассы. Это предъявляет повышенные требования к процессам дозирования жидкостей, обеспечивающих регулирование процесса на обоих этапах.

9.2. Особенности технических систем, предназначенных для дозирования жидкостей

Особенности процессов, реализуемых в микробиологических производствах при получении чистых культур микроорганизмов, предъявляют определенные требования к техническим системам дозирования. Важнейшим из них является обеспечение своевременной и точной подачи нужных компонентов в культуральную жидкость по программе, гарантирующей поддержание целевых

микроорганизмов в нужном физиологическом состоянии. Очевидно, что с позиций обсуждаемой нами проблемы должны достигаться и поддерживаться асептические условия подачи жидкостей. Методический подход к решению этой задачи принципиально не отличается от того, который применяют для выполнения требований асептики в любых других технических системах микробиологических производств.

На первом этапе создания систем нужно обоснованно сформулировать требования к производительности дозатора и точности подачи дозируемой жидкости, затем — к эффективности герметизации всех элементов и узлов, особенно непосредственно соприкасающихся с дозируемой жидкостью. При этом дозатор целесообразно рассматривать как часть технической системы (например, МСА или установки непрерывной стерилизации питательной среды) и предъявлять требование к герметичности, исходя из необходимой эффективности герметизации системы в целом.

Безусловно, специфическим требованием является необходимость гарантированной стерилизации внутренних объемов системы дозирования при режимах, характерных для термической обработки технических систем микробиологических производств. Поэтому для всех конструкций дозаторов должна предусматриваться возможность стерилизации их элементов и узлов, соприкасающихся непосредственно с дозируемыми жидкостями. Такая стерилизация проводится с помощью насыщенного водяного пара под давлением при режимах, существующих для других аппаратов и узлов данной системы.

При обеспечении стерилизуемости основное внимание нужно обращать на исключение «слабых» точек, имеющих пониженную температуру и не гарантирующих достижение требуемого стерилизующего эффекта. Одним из направлений в решении этой задачи является уменьшение удельной поверхности элементов и узлов, стерильность которых должна быть обеспечена. Желательно резервирование «слабых» элементов и узлов, например уплотнения штока насоса-дозатора. В этом плане установка двойного сильфона с автоматической сигнализацией момента прорыва одного из них [77] представляется исключительно важным моментом в создании систем с контролируемой асептической эффективностью.

9.3. Некоторые результаты экспериментальной оценки насоса-дозатора

Приведем некоторые результаты экспериментальной оценки одной из модификаций дозирующего диафрагменного (сильфонного) насоса, предназначенного для подачи различных жидкостей в асептических условиях. Основным узлом насоса является дозирующая гидравлическая головка [77] (рис. 30). Возможность достижения

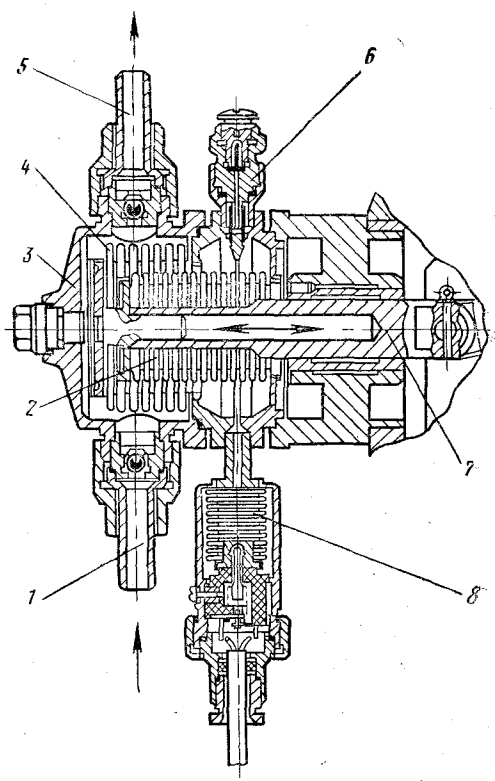


Рис. 30. Гидравлическая головка сильфонного дозировочного насоса:

1 — патрубок всасывающий; *2* — дублирующий сильфон поршня; *3* — корпус головки; *4* — рабочий сильфон поршня; *5* — патрубок нагнетательный; *6* — клапан ниппельный; *7* — шток сильфонного поршня; *8* — пневмоэлектрический датчик.

и гарантированного поддержания асептических условий в дозирующей головке подтверждена экспериментально путем проверки герметичности с помощью галоидного течеискателя, а также изучения стерилизуемости внутренних полостей с оценкой температурных полей и после-

дующим дозированием предварительно простерилизованной питательной среды. Дозирующая головка указанной конструкции может стерилизоваться так же, как и все элементы монтажных схем ферментаторов, т. е. с помощью водяного насыщенного пара, подающегося под давлением.

Как уже отмечалось, важной характеристикой дозаторов является производительность, поэтому приведем некоторые результаты, полученные при дозировании подсолнечного масла (рис. 31, *а*) и 40%-ного водного раствора глюкозы (рис. 31, *б*). Линейная зависимость произ-

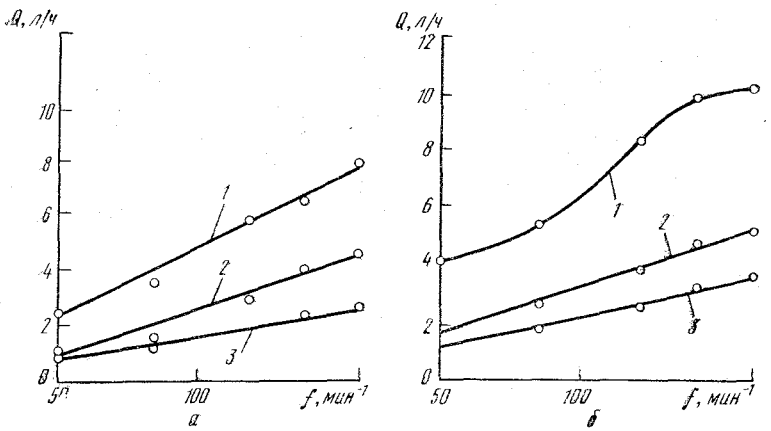


Рис. 31. Изменение производительности дозатора по подсолнечному маслу (*а*) и 40%-му водному раствору глюкозы (*б*) в зависимости от частоты колебаний сильфонного поршня (*f*) при различной величине амплитуды:

1 — 0,50 мм; *2* — 0,35 мм; *3* — 0,2 мм; *Q* — производительность насоса.

водительности от частоты наблюдается для амплитуд 0,2 и 0,35 мм во всем диапазоне изученных частот (50—160 колебаний в минуту).

Для каждого типа конструкции сильфонных насосов-дозаторов должны экспериментально устанавливаться допустимые диапазоны изменения как амплитуды, так и частоты колебаний сильфонного поршня. Применительно к рассмотренной выше конструкции показано, что с ве-

роятностью 99% ошибка дозирования не будет превышать 1%, если выполняются требования неравенств:

$$20 \text{ мин}^{-1} \leqslant f \leqslant 160 \text{ мин}^{-1}, \quad (196)$$

$$0{,}4 \text{ мм} \leqslant d \leqslant 1{,}5 \text{ мм}. \quad (197)$$

По-видимому, конкретные величины амплитуды и частоты колебаний сильфонного поршня будут различными для отличающихся типов конструкций дозаторов. Их экспериментальное определение гарантирует в последующем необходимую точность дозирования, а следовательно, и стабильность поддержания требуемого параметра, например pH.

9.4. Пути совершенствования конструкции дозаторов

К настоящему времени создано большое число систем дозирования жидкостей в асептических условиях, однако они еще не в полной мере отвечают требованиям микробиологических производств. Учитывая направленность книги, остановимся лишь на тех вопросах, которые непосредственно относятся к промышленной асептике.

В первую очередь нужно обеспечить гарантированную стерилизуемость дозирующих головок, особенно предназначенных для малых расходов. Создание головок с минимальной удельной поверхностью, обеспечивающих свободный доступ пара во все точки внутреннего объема, является одной из важных задач в проблеме совершенствования конструкций дозаторов.

Новые конструкции дозирующих головок должны гарантированно исключать возможность проникновения контаминантов через клапанную систему в том случае, если произошла случайная разгерметизация или посторонняя микрофлора проникла во внутреннюю полость дозатора другим путем. Кроме того, необходимо гарантированно исключить контакт дозируемых жидкостей с внешней средой, поскольку в этом случае будут обеспечены требования как технологии в отношении асептики, так и производственной санитарии [недопустимость загрязнения окружающего воздуха целевыми микроорганизмами и (или) продуктами их жизнедеятельности].

В плане решения задач микробиологической технологии любое вновь создаваемое дозирующее устройство должно рассматриваться как неотъемлемый элемент до-

статочно сложных технических систем, работающих в асептических условиях и осуществляющих функции транспортировки и дозирования стерильных жидкостей или чистых культур микроорганизмов. Именно с этих позиций нужно формулировать и требования к конструкции конкретного дозатора.

10. МАТЕМАТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ КОНТРОЛЯ СТЕРИЛЬНОСТИ МАТЕРИАЛЬНЫХ ПОТОКОВ И ЧИСТОТЫ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ

В литературе уже неоднократно отмечалось, что в термин «контроль качества» специалисты вкладывают различный смысл. Так, для многих конструкторов этот термин может означать сужение или расширение прав и обязанностей; для технологов микробиологических производств — необходимость контроля за тщательным соблюдением требований регламентов; для аппаратчиков — контроль за качеством каждой операции при подготовке аппаратов и коммуникаций, а также за соблюдением параметров и показателей в ходе рабочего цикла; для микробиологов — изучение свойств получаемых популяций микроорганизмов или продуктов на их основе и сопоставление их с установленными стандартными показателями.

Одной из важнейших особенностей контроля качества на микробиологических предприятиях является то, что этими вопросами должен заниматься почти каждый работник. Отклонение в качестве исходного сырья, контролируемого отделом технического контроля, неизбежно приведет к снижению качества питательных сред, далее — к неудовлетворительному качеству культуральной жидкости и конечных продуктов. Низкое качество посевного материала не позволит обеспечить получение требуемого продукта даже при правильном решении всех остальных вопросов. Низкое качество подготовки ферментера сведет на нет усилия специалистов других служб.

В данном разделе вопросы контроля качества мы обсудим только применительно к проблеме получения чистых культур микроорганизмов. Однако основные методические подходы могут быть использованы и при ре-

шении других задач, характерных для микробиологических производств.

Использование на практике математических методов оценки эффективности обработки различных материальных потоков, а в конечном итоге их стерильности, или чистоты (применительно к популяциям целевых микроорганизмов), в принципе направлено на решение трех задач: количественная характеристика применяемых режимов; оценка достоверности заключений по результатам экспериментального изучения отбираемых проб жидкостей, воздуха, продуктов; теоретическое прогнозирование ожидаемого числа чистых операций.

В практике работы микробиологических производств можно выделить несколько контрольных процессов и операций, являющихся типовыми и вытекающих из существа микробиологического синтеза. К ним относятся: отбор проб воздуха из помещений, технологических и вентиляционных систем и исследование проб для выдачи заключения об обсемененности воздуха производственной или посторонней микрофлорой; отбор проб питательной среды и других технологических жидкостей после стерилизации, их исследование на наличие посторонней микрофлоры; отбор и исследование проб культуральной жидкости и готовых препаратов на присутствие в них контаминантов.

Применительно к производствам, в которых требуется гарантированное обеспечение асептических условий, факты обнаружения посторонней микрофлоры в том или ином материальном потоке свидетельствуют о существенных пропусках в соответствующих технических системах и грубых нарушениях режимов обработки. В таких случаях единственно правильным решением являются тщательная и всесторонняя проверка систем, обнаружение причин контаминации и их устранение. Значительно сложнее обстоит дело в ситуациях, когда посторонние микроорганизмы не выявлены из-за очень низкой чувствительности современных методов индикации применительно к жидким и воздушным средам, а также поверхностям оборудования, помещений, приборов, одежды персонала. На практике всегда имеется какая-то вероятность присутствия контаминантов в контролируемом потоке (или замкнутом объеме), однако оценить ее можно только расчетными методами с помощью современно-

го аппарата математической статистики и теории вероятностей. Поскольку по теории вероятностей факты обнаружения контаминантов в стерилизуемых материальных потоках, культуральной жидкости или готовых препаратах не имеют принципиальных различий, мы будем излагать вопросы контроля качества на примере контроля стерильности.

Применительно к различным жидкостям принцип контроля стерильности заключается в следующем: берут выборочную пробу из материала и переносят ее в питательную среду, которая способствует размножению микроорганизмов. На основании полученных на выборочной пробе данных о ее стерильности или наличии способных к размножению микроорганизмов можно сделать вывод о стерильности всего продукта, из которого была взята выборочная проба. Согласно этому принципу контроль качества подчиняется определенным статистическим закономерностям. Таким образом, контроль выборочной пробы не дает каких-либо сведений о фактическом состоянии всей партии продукта, из которого была взята выборочная проба. Существует лишь более или менее высокая вероятность того, что полученные на выборочной пробе результаты действительны и для всего продукта. При этом предполагают, что продукт был гомогенным и при взятии выборочной пробы каждый элемент мог стать ее составной частью (принцип случайной выборки). Все количество идентичного по происхождению, составу и обработке продукта характеризуется как партия. В микробиологических производствах, по-видимому, целесообразно принимать за партию продукт, полученный из одного слива ферментатора при условии, что весь объем культуральной жидкости обрабатывался затем при стандартных режимах. Чем больше выборочная проба, тем выше вероятность того, что партия обладает одинаковыми с пробой свойствами. Следовательно, самыми достоверными будут такие показания контроля стерильности, при которых и выборочная проба, и партия идентичны, т. е. если вся партия исследуется на данный показатель. Очевидно, что в условиях любых микробиологических производств выполнение этого требования не представляется реальным не только из-за значительных объемов материалов, содержащих микробные популяции, но и из-за отсутствия

соответствующих (в том числе и экспрессных) методов контроля.

Как правило, выборочная проба составляет лишь незначительную часть партии. Поэтому вполне возможно, что исследуемые как выборочные пробы образцы оказываются стерильными, а в остальной партии еще имеются способные к размножению микроорганизмы. Как показали расчеты [42], контроль стерильности может давать сведения лишь в том, что содержание микроорганизмов в партии с определенной вероятностью не превышает какого-то значения. В такой ситуации изготовителю стерильного продукта не остается ничего иного, как допустить определенный риск доведения нестерильной партии до потребителя, например в случае централизованной стерилизации контрольных питательных сред и последующей передачи их в цеховые лаборатории или при стерилизации питательных сред на УНС и загрузке их в промышленные ферментаторы. Степень этого риска зависит от размера выборочной пробы: она тем меньше, чем больше этот размер. Менее очевидным является отношение между риском и относительной величиной размера выборочной пробы к партии.

В каждой лаборатории и на производстве при контроле стерильности имеется опасность занесения микроорганизмов из окружающей среды в исследуемую пробу или питательные среды, используемые для обнаружения способных к размножению микроорганизмов. Поскольку контроль стерильности не дает никаких сведений о путях поступления посторонней микрофлоры, т. е. опасность ошибочно считать чистую партию контаминированной. Это случается тем чаще, чем больше выборочная проба. Такое заключение во многих случаях может привести к сливу в канализацию фактически кондиционных полупродуктов, т. е. к нанесению прямого экономического ущерба производству.

Некоторые инструкции по контролю учитывают возможность контаминирования выборочных проб при проведении контроля стерильности, поэтому партия может считаться пригодной также и в том случае, если одна или некоторое число выборочных проб оказались нестерильными. Поэтому вполне закономерным является вопрос, в какой мере увеличивается вследствие этого вероятность принятия содержащей микроорганизмы пар-

тии за чистую. Одновременно возникает и другой практический вопрос — может ли (и в какой мере) быть уменьшен риск изготовления контаминированной партии продукта за счет увеличения выборочной пробы или контроля повторной выборочной пробы.

Многие авторы уже неоднократно решали проблемы контроля стерильности [109, 128, 157]. Например, отмечалось [109, 135], что для контроля стерильности можно применять биномиальное распределение. При этом авторы ограничились размером выборочных проб $n=10$ единицам, вычислив для некоторых степеней контаминирования соответствующие вероятности заключения о пригодности нестерильной партии. Эти же исследователи определили и вероятность ошибочного заключения о пригодности при повторном контроле, если не все единицы первой выборочной пробы были стерильными. При этом указывалось на невозможность путем контроля выборочной пробы дать гарантию стерильности всей партии. Показана возможность применения гипергеометрического распределения для контроля стерильности и вычислены некоторые кривые вероятности для размера выборочных проб $n=10$, 15 и 20 и размеров партий $N=50\div10000$ [128]. Установлено, что вероятность заключения о пригодности контаминированной партии в первую очередь зависит от размера выборочной пробы.

Весьма обстоятельно вопрос об использовании вероятностных законов для оценки стерильности рассмотрен в работе [157]. При этом анализ литературы авторы дополнили результатами собственных исследований. Изложение вопросов контроля далее базируется в основном на результатах этой работы.

10.1. Контроль стерильности как вероятностно-статистическая задача

По теории вероятностей контроль стерильности представляет не что иное, как игру в лотерею [12, 15, 116, 117]. Извлеченная выборочная проба, поскольку она должна соответствующим образом обрабатываться и готовиться для контроля стерильности, в партию не возвращается. Размер партии в результате контроля стерильности уменьшается на размер выборочной пробы. По состоянию выборочной пробы можно, таким образом,

судить о состоянии уменьшенной на отобранную пробу партии. При использовании обычных для вероятностной математики терминов в практике контроля стерильности возникает трудность, так как наступление определенного события обычно отмечается как успех, а ненаступление — как неудача. При контроле стерильности только от практического работника зависит, считать ли нахождение нестерильной пробы как успех или как неудачу. Для того чтобы было можно использовать обычную терминологию, в этом разделе по аналогии с работой [157] нахождение нестерильной пробы будем рассматривать как успех.

Партия состоит из более или менее большого количества одинаковых единиц (например, пробирок с питательной средой), которые отличаются лишь тем, что некоторые из них нестерильные, а остальные стерильные. Если из подобной партии при соблюдении принципа случайности берут выборочную пробу, то эта партия с определенной вероятностью будет содержать и нестерильные единицы. Эту вероятность можно рассчитывать с помощью гипергеометрического, биномиального или пуассоновского распределения. Однако такие распределения выборочно применяют лишь при определенных условиях.

Вероятность заключения о пригодности партий, небольших по отношению к размеру выборочной пробы. Вероятность P того, что одна состоящая из n единиц выборочная проба содержит нестерильные единицы, вычисляют с помощью гипергеометрического распределения:

$$P = \frac{\binom{D}{d}\binom{N-D}{n-d}}{\binom{N}{n}}; \qquad (198)$$

$$d = 0,\ 1,\ 2,\ \ldots,\ n;\quad d \leqslant D;\quad n-d \leqslant N-D,\quad \binom{D}{d} = \frac{D!}{d!(D-d)!},$$

где D — количество нестерильных единиц в партии; d — количество нестерильных единиц в выборочной пробе; N — размер партии; n — размер выборочной пробы. В работе [157] указана область применения распределения: $n > 0{,}1\,N$.

Вероятность того, что выборочная проба содержит определенное количество нестерильных единиц d, зави-

сит, таким образом, от размера партии N, количества нестерильных единиц в партии D и размера выборочной пробы n. На практике партия часто считается нестерильной в том случае, если из исследуемых в качестве выборочной пробы единиц одна или несколько оказались нестерильными. Особого внимания при осуществлении контроля стерильности заслуживает вопрос, с какого момента выборочная проба не будет содержать нестерильные единицы ($d=0$), хотя в партии находится определенное количество нестерильных единиц. Уравнение (198) для этого случая выглядит следующим образом:

$$P_0 = \frac{(N-D)!\,(N-n)!}{(N-n-D)!\,N!}. \qquad (199)$$

Поскольку P_0 указывает на вероятность, с которой выборочная проба не содержит нестерильных единиц (хотя в партии они имеются), эта же величина одновременно указывает и на вероятность, с которой нестерильная партия признается пригодной (рис. 32). Из рис. 32 видно, что чем меньше количество контаминированных единиц, тем больше вероятность заключения о пригодности нестерильной партии. Так, если партия состоит из 20 единиц ($N=20$) и пять из них исследуют на стерильность, то P_0 партии, контаминированной на 50% ($D=10$), составляет 1,6%. Если партия контаминирована на 25% ($D=5$), то P_0 составляет 19%; при степени контаминирования 10% ($D=2$) эта величина уже превышает 50%. Для того чтобы обнаружить более незначительное контаминирование, нужно бóльшее количество выборочных проб. Однако при этом уменьшается вероятность пригодности партии. Если, например, для партии, включающей 10% нестерильных единиц, в качестве выборочной пробы исследуют 15 единиц, то вероятность пригодности составит 5%. Поскольку $N=20$, то 75% всей партии должны были бы использоваться для контроля стерильности.

Уже отмечалось, что в партии с незначительной степенью контаминирования можно идентифицировать постороннюю микрофлору с большой уверенностью лишь в том случае, если вся партия подвергается контролю. На графиках рис. 32 масштаб по оси абсцисс выбран так, что несмотря на различную величину партии, одинаковые значения отношения D/N находятся на одном рас-

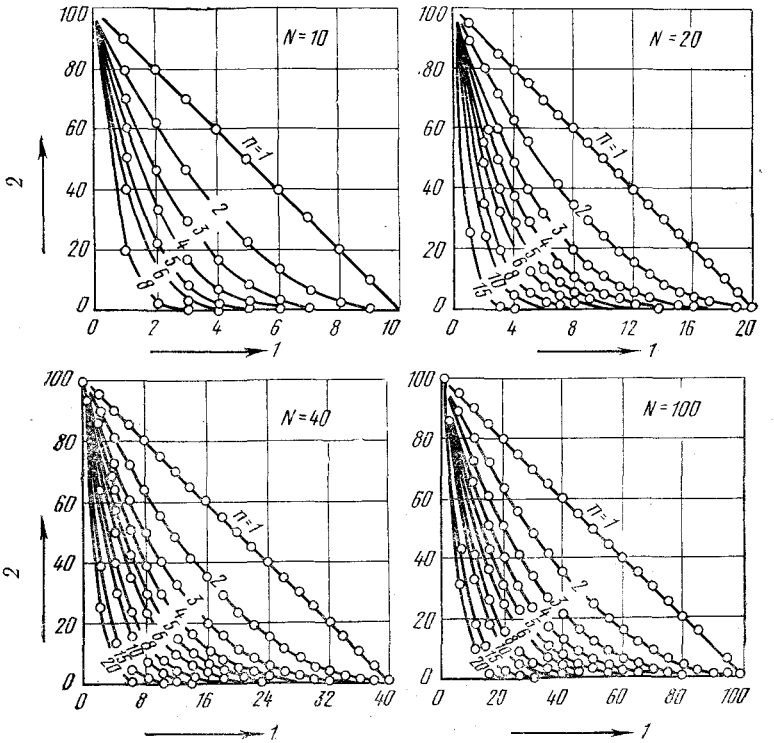


Рис. 32. Зависимость вероятности вывода о пригодности нестерильной партии (P_0) от количества содержащихся в партии нестерильных единиц (D), размера выборочной пробы (n) и величины партии (N)

Вероятность заключения о пригодности вычисляли с помощью гипергеометрического распределения: *1* — количество нестерильных единиц в партии; *2* — вероятность пригодности (в %).

стоянии от ординаты (частное D/N трактуют и как степень контаминирования p; умножение этого частного на 100 дает степень контаминирования в процентах). Этот способ изображения мы избрали потому, что на практике чаще всего абсолютное количество нестерильных единиц, содержащихся в партии, имеет меньшее значение, чем относительное содержание (D/N или 100 D/N). Таким образом, степень контаминирования 50 или 25% соответствует (независимо от абсолютной величины партии) 1/2 или 1/4 длины абсциссы. Данный способ позво-

ляет нагляднее проследить зависимость вероятности вывода о пригодности нестерильной партии от величины N или D/N и n. По-видимому, такой методический подход наиболее целесообразен и для производственных микробиологических лабораторий, выдающих заключение о чистоте больших объемов культуральной жидкости, воздуха и др.

Как можно видеть из изображенных на рис. 32 зависимостей, для $n=1$ вероятность вывода о пригодности зависит лишь от степени контаминирования партии. С увеличением n вероятность принятия контаминированных партий уменьшается (причем для небольших партий более значительно, чем для больших). Для степени контаминирования 10% и величины выборочной пробы $n=5$ вероятность вывода о пригодности для одной состоящей из 10 единиц партии составляет, например, 50%; если партия состоит из 20 единиц, то вероятность принятия равна 55%, из 40 единиц — 58% и из 100 единиц — 60%. По представленным графикам можно оценить и влияние n на вероятность вывода о пригодности партии. Для степени контаминирования 10% и $N=10$ изменение n с 5 до 8 меняет вероятность от 50 до 20%; для $N=20$ — от 55 до 35%; для $N=40$ — от 58 до 40%; для $N=100$ — от 60 до 42%. Вероятность вывода о пригодности нестерильной партии в таком случае зависит только от размера выборочной пробы n и степени контаминирования партии $D/N=p$, а не от размера партии.

Вероятность вывода о пригодности партий, существенно бóльших выборочной пробы. Вероятность заключения о пригодности нестерильной партии, как упоминалось, можно вычислить с помощью различных функций распределения. Гипергеометрическое распределение полностью соответствует соотношениям, которые даются при контроле стерильности: взятая из партии единица снова к партии не добавляется. Биномиальное распределение предполагает, что каждая проба, изъятая из партии, возвращается в нее до отбора следующей пробы.

Для обеспечения однородности исследуемой партии ее следует перемешивать, с тем чтобы для каждой единицы существовала одинаковая вероятность попасть в пробу. Биномиальное распределение по сравнению с гипергеометрическим имеет то преимущество, что требуе-

мые значения могут вычисляться значительно проще. Важно, что при этом сохраняются границы, внутри которых биномиальное распределение можно применять для такого рода расчетов.

Смысл выражения «изъятие пробы с возвратом» состоит в том, что во время последовательного отбора остается постоянной вероятность отбора из партии нестерильной единицы. Это предположение реально с более или менее большим приближением лишь в том случае, если (как чаще всего бывает в практике контроля стерильности) в качестве выборочной пробы исследуют лишь сравнительно незначительную часть партии. Частоту выборочных проб, которые будут содержать определенное количество нестерильных единиц d, вычисляют согласно биномиальному распределению с помощью уравнения

$$P = \binom{n}{d} p^d (1-p)^{n-d}, \qquad (200)$$

где $\binom{n}{d} = \frac{n!}{d!\,(n-d)!}$; область применения по работе [34]: $n \leqslant 0{,}1N$ и $N > 60$.

В этом уравнении размер партии N присутствует косвенно. Вероятность того, что выборочная проба не содержит ни одной нестерильной единицы ($d=0$), хотя партия в определенной степени (p) состоит из нестерильных единиц:

$$P_0 = (1-p)^n. \qquad (201)$$

Вероятности вывода о пригодности P_0 нестерильных партий, вычисленные по формуле (201) для различных степени контаминирования партии p и размера выборочной пробы n, представлены на рис. 33. Вероятность вывода о пригодности нестерильной партии увеличивается с уменьшением степени контаминирования и уменьшается с увеличением размера выборочной пробы. Например, при степени контаминирования партии 2% вероятность вывода о пригодности нестерильных партий составляет: 82% при $n=10$; 68% при $n=20$; 30% при $n=60$. При степени контаминирования 1% эти вероятности увеличиваются: 91% при $n=10$; 82% при $n=20$; 55% при $n=60$ Приблизительно с $n=10$ кривые подобны друг другу и при удвоении размера выборочной пробы сдвигаются

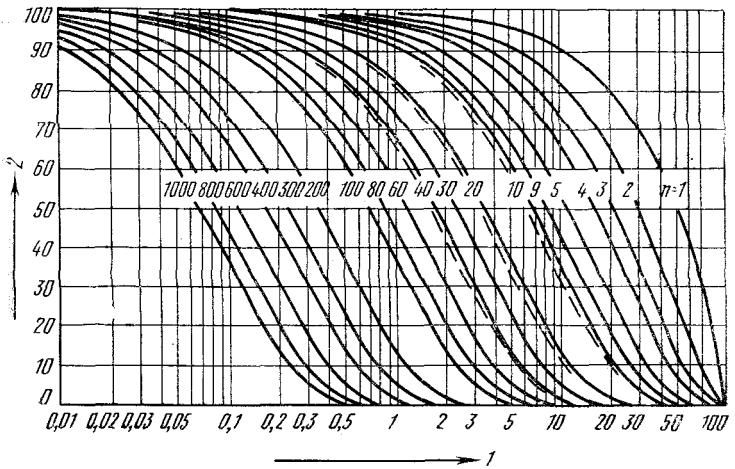


Рис. 33. Вероятность вывода о пригодности нестерильной партии (P_0) со степенью контаминирования (p) и размером выборочной пробы (n).

Вероятность вывода о пригодности вычисляли с помощью биномиального распределения (сплошная линия) или гипергеометрического распределения (штриховые линии), штриховые линии действительны для партий, которые в 10 раз больше, чем выборочная проба: *1* — степень контаминирования партии (в %); *2* — вероятность пригодности (%).

влево с постоянным интервалом. Для сравнения на рис. 33 даны штриховые кривые при $n=10$, 20 и 40, построенные на основании гипергеометрического распределения.

Построенные согласно гипергеометрическому и биномиальному распределению кривые по внешнему виду одинаковые, однако несколько сдвинуты параллельно оси абсцисс. Величина этого сдвига зависит от отношения n/N. Для $N=10n$ расхождение между вероятностями заключения о пригодности, установленными по обеим функциям распределения, незначительное, и при расчетах может применяться биномиальное распределение, с которым значительно проще манипулировать. Одновременно это означает, что вероятность пригодности практически зависит уже от размера не партии, а выборочной пробы (и степени контаминирования партии).

Поскольку степень контаминирования партии заранее не известна, то контроль стерильности должен дать информацию о том, переходит ли этот параметр опреде-

ленную границу. Количественная оценка нестерильных проб основана на статистических закономерностях. Именно поэтому данные, получаемые в результате контроля стерильности, действительны лишь с бо́льшей или меньшей вероятностью. Например, если в одной выборочной пробе все 10 единиц оказываются стерильными, то речь может идти с 95%-ной вероятностью о партии со степенью контаминирования 0,5%. С вероятностью 90% степень контаминирования партии может составлять 1%, с вероятностью 50% — 6,7% и с вероятностью 10% — 20,6%. Если стерильной оказалась выборочная проба из 20 единиц, то возможные степени контаминирования соответственно ниже: 0,26, 0,5, 3,4 и 11% [157].

Количество единиц n, которое нужно исследовать с тем, чтобы взятая из контаминированной партии (степень контаминирования p) выборочная проба с определенной вероятностью содержала не менее одной контаминированной единицы, показано на рис. 34. Например, имеется большая партия пробирок с питательной средой ($N \gg n$), степень контаминирования 1%. Требуется определить число пробирок, которое необходимо исследовать, чтобы проба содержала не менее одной контаминированной пробирки. Из рис. 34 следует, что для $P=90\%$ $n=200$, для $P=95\%$ $n=300$, для $P=99\%$ $n=450$.

Важно подчеркнуть, что при $N \gg n$ вероятность принятия нестерильной партии не зависит от размера партии. Это дает возможность находить оптимальные соотношения между вероятностью вывода о пригодности нестерильной партии и экономичностью методов приготовления и контроля (в отношении размера партии и

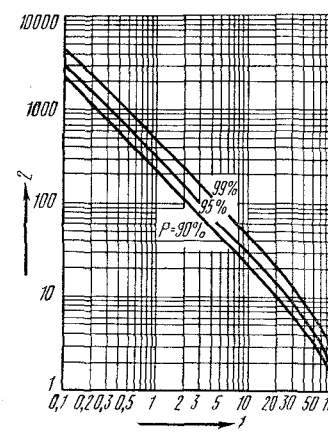


Рис. 34. Отношение между степенью контаминирования партии (p) и количеством единиц (n), которое должно исследоваться, чтобы выборочная проба с вероятностью (P) 90, 95 и 99% содержала, по крайней мере, одну контаминированную единицу:

1 — степень контаминирования партии (%); *2* — размер выборочной пробы.

размера выборочной пробы). Эту ситуацию можно пояснить на примере. Если из партии в 1000 единиц на стерильность контролируются 10 единиц, то вероятность заключения о пригодности нестерильной партии со степенью контаминирования $p=10\%$ будет составлять 35%. Из партии в 10 единиц 7 единиц, т. е. более 50% партии, должны контролироваться на стерильность, чтобы достигнуть такой же вероятности принятия нестерильной партии. При размере партии $N=20$ потребовалось бы проконтролировать 8 единиц, т. е. менее 50%; при $N=100$—9 единиц (см. рис. 32). Если изготовители микробиологических продуктов заинтересованы в том, чтобы партия обладала лишь незначительной степенью контаминирования, то они должны контролировать по возможности большую выборочную пробу. Но поскольку расходы на контроль стерильности повышаются с увеличением размера выборочной пробы, то по соображениям рентабельности целесообразно стремиться изготовлять большие партии.

Приведенные выше результаты расчетов действительны лишь до тех пор, пока партия соответствует ситуации, при которой для каждой единицы партии имеется одинаковая опасность контаминирования [157]. С увеличением размера партии (отчасти по техническим причинам) это требование выполнить значительно труднее.

При количественной оценке стерильности часто пользуются распределением Пуассона. При большом n и небольшом p биномиальное распределение переходит в распределение Пуассона, которое можно применить для вычисления вероятности заключения о пригодности нестерильных партий, контролируемых посредством выборочных проб. Распределение Пуассона имеет то преимущество, что рассчитать вероятности заключения о пригодности для $d\geqslant 2$ значительно проще, чем при биномиальном распределении. Для распределения Пуассона действительно:

$$P=\frac{(np)^d}{d!}\exp(-np). \qquad (202)$$

В таком случае вероятность того, что выборочная проба не содержит нестерильных единиц ($d=0$):

$$P_0 = \exp(-np). \qquad (203)$$

На рис. 35 сравниваются кривые вероятности заключения о пригодности, вычисленные по распределению Пуассона и биномиальному распределению для $d=0$.

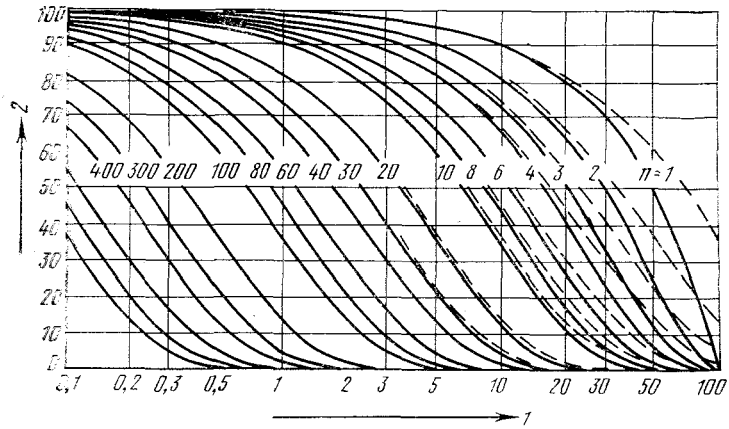


Рис. 35. Сравнение вероятностей заключения о пригодности нестерильной партии, вычисленных с помощью биномиального распределения (сплошные линии) и распределения Пуассона (пунктирные линии).

1 — степень контаминирования партии (в %); *2* — вероятность заключения о пригодности (в %).

Указанные вероятности (P_0) даны в зависимости от степени контаминирования партии (p, абсцисса) и размера выборочной пробы (n). При степенях контаминирования более 20% между значениями P_0, вычисленными по двум распределениям, чаще всего имеются значительные различия.

Эти значения становятся меньше при снижении p и увеличении n.

При степени контаминирования менее 5% отклонения между величинами P_0 так незначительны, что для рассмотрения обсуждаемых вопросов могут использоваться оба распределения.

10.2. Пригодность партии при содержании в выборочной пробе не более одной нестерильной единицы

Вероятность признания пригодной контаминированной партии для случая, когда вся выборочная проба оказывается стерильной, обозначим P_A, а для случая, когда партия считается безупречной, несмотря на то, что одна из исследованных единиц контаминирована, — P_B. В основу расчетов можно положить формулы:

$$P_A = (1-p)^n, \tag{204}$$

$$P_B = (1-p)^n + np\,(1-p)^{n-1}. \tag{205}$$

При этом речь идет о расчетных формулах для 1-го или 1-го и 2-го членов биномиального распределения. Для того, чтобы проще обнаружить различие между обеими вероятностями, формулу (205) надо привести к виду:

$$P_B = (1-p)^n + \frac{np\,(1-p)^n}{(1-p)} = (1-p)^n\left[1 + \frac{np}{(1-p)}\right]. \tag{206}$$

В соответствии с этим вероятности заключения о пригодности P_A и P_B различаются лишь на множитель $\left[1 + \frac{np}{(1-p)}\right]$. На рис. 36 представлены кривые, вычисленные для $n=10$ и 100, а также $p \geqslant 0{,}01\%$. При переходе от одного метода контроля (A) к другому (B) ход кривых изменяется независимо от размера выборочной пробы одинаково: касательная к точке перегиба становится круче на одно и то же значение, а сама точка перегиба сдвигается на постоянное значение вправо в область более высокой степени контаминирования.

График представлен в полулогарифмических координатах, поэтому кажется, что изображенные пары кривых приближаются друг к другу асимптотически. Поэтому может возникнуть впечатление о том, что различие между P_A и P_B с увеличением степени контаминирования партии исчезает. Это соотношение можно пояснить на примере. Для степени контаминирования партии 10% и $n=10$ $P_A=34{,}9\%$, $P_B=73{,}6\%$, т. е. приблизительно в 2 раза больше, для степени контаминирования партии 40% $P_A=0{,}60\%$ и $P_B=4{,}64\%$, т. е. приблизительно в 8 раз больше.

Для практики заключение о пригодности партии с высокой степенью контаминирования значительно более

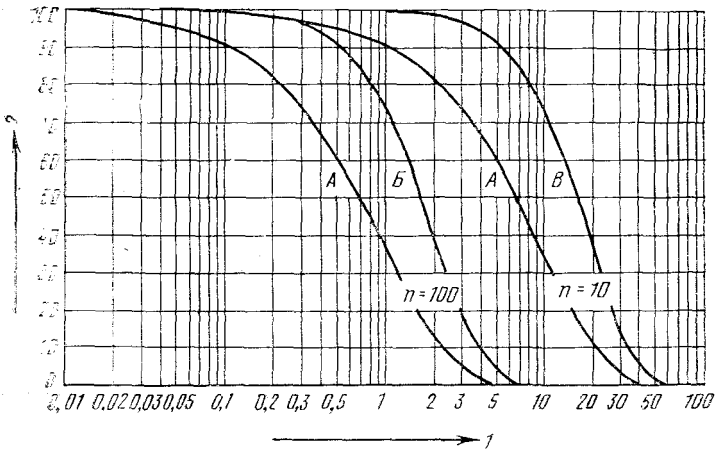


Рис. 36. Соотношение между вероятностью вывода о пригодности *нестерильных партий и их степенью контаминирования для контроля А* (вся выборочная проба должна быть стерильной) и контроля *В* (партия считается пригодной, если выборочная проба содержит не более одной нестерильной единицы); кривые действительны для размера выборочной пробы $n=10$ или $n=100$:
1 и *2* — то же, что на рис. 35.

нежелательно, чем заключение о кондиционности партии с низкой степенью контаминирования. Если в некоторых случаях допускается содержание одной нестерильной единицы в выборочной пробе, следует принять меры для того, чтобы не повысилась вероятность принятия значительно контаминированных партий. Этого можно достичь путем увеличения выборочной пробы. На рис. 37 кривые, рассчитанные для контрольного метода *А* (вся выборочная проба должна быть стерильной) при $n=10$ или 20, сравниваются с кривыми, рассчитанными для контрольного метода *В* (выборочная проба может содержать одну нестерильную единицу) при $n=10$, 20, 30, 40, 60 или 80. Интересно, что кривые, действительные для метода *В* (при соответствующем выборе), пересекают кривые, относящиеся к методу *А*. Точки пересечения с увеличением размера выборочной пробы перемещаются в направлении более незначительных степеней контаминирования партии. Если при методе *А* в качестве выборочной пробы исследовали 10 единиц, а при ме-

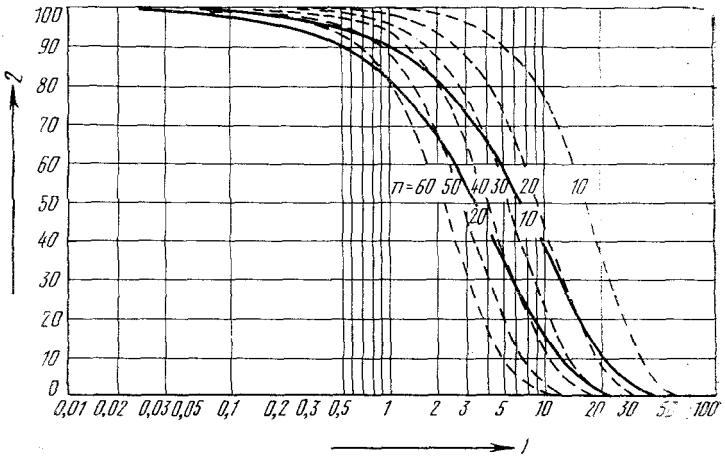


Рис. 37. Сравнение вероятностей заключения о пригодности нестерильных партий в зависимости от степени контаминирования (p) для методов контроля A (сплошные линии) и B (штрихпунктирные линии) при различном размере выборочной пробы (n):

1 и 2 — то же, что на рис. 35.

тоде B 20 единиц, то при методе B для партий со степенью контаминирования более 12% имеется более незначительная вероятность вывода о пригодности, чем при методе A. Если с помощью метода B исследовали выборочную пробу из 30 единиц, то этот метод вплоть до степеней контаминирования 3,7% обладает более низкими вероятностями заключения о пригодности нестерильной пробы, чем метод A, и т. д.

Контрольный метод, при котором партия считается пригодной также в том случае, если выборочная проба содержит нестерильную единицу, по сравнению с контрольным методом, при котором вся выборочная проба должна быть стерильной, вообще нельзя оценивать как плохой. Такой метод может даже значительно превосходить метод A, если речь идет о том, чтобы исключить партии с высокой степенью контаминирования. Решающим фактором является размер выборочной пробы. Однако следует иметь в виду, что при этом одновременно повышается вероятность принятия партий с незначительной степенью контаминирования. Предел, начиная с которого следует считаться с повышенной вероятностью

принятия некондиционных партий, при увеличении размера выборочной пробы может быстро перемещаться в область допустимых степеней контаминирования.

10.3. Повторный контроль при содержании в выборочной пробе одной или нескольких нестерильных единиц

Некоторые варианты контроля, которые допускают повторение испытания на стерильность, сопряжены с опасностью ошибочно принять стерильный продукт за нестерильный вследствие чужеродного контаминирования выборочных проб. Если при первом контроле одна (или несколько) из исследуемых единиц оказывается нестерильной, то можно провести проверку новой выборочной пробы из одинаковой партии. Партия считается кондиционной, если при втором контроле все единицы были свободны от способных к размножению микроорганизмов.

Вероятность принятия нестерильной партии за кондиционную можно рассчитать и с помощью биномиального распределения. Для случая, если при первом контроле выборочная проба содержит не более одной нестерильной единицы, вероятность заключения о пригодности нестерильной партии (тип контроля C) рассчитывают по формуле

$$P_C = (1-p)^n + [np\,(1-p)^{n-1}] \cdot (1-p)^n. \qquad (207)$$

Вероятность того, что в первой выборочной пробе все единицы стерильные | Вероятность того, что первая выборочная проба содержит одну нестерильную единицу | Вероятность того, что во второй выборочной пробе все единицы стерильные

Если повторный контроль разрешается даже в том случае, когда первая выборочная проба содержит не одну, а несколько нестерильных единиц (тип контроля D), то вероятность признания пригодной нестерильной партии вычисляется с помощью следующего уравнения:

$$P_D = (1-p)^n + [1-(1-p)^n] \cdot (1-p)^n. \qquad (208)$$

Вероятность того, что в первой выборочной пробе все единицы стерильные | Вероятность того, что в первой выборочной пробе не все единицы стерильные | Вероятность того, что во второй выборочной пробе все единицы стерильные

На рис. 38 представлены вероятности заключения о пригодности, вычисленные для контроля типов A, B, C и D при $n=10$ в зависимости от степени контаминирования партии. Оказалось, что все кривые, действительные для типов контроля, при которых выборочная проба может содержать нестерильные единицы (B, C, D), в средней области более крутые, чем при контроле A (партия считается кондиционной лишь тогда, когда все единицы выборочной пробы были стерильными). В предыдущем разделе отмечалось, что вероятность вывода о пригодности нестерильных партий значительно повышается (при одинаковом размере выборочной пробы), если партия объявляется кондиционной даже в том случае, когда выборочная проба содержит нестерильную единицу (ср. кривую A с кривой B рис. 38). Это повышение вероятности можно значительно уменьшить, если одновременно требовать, чтобы выборочная проба одинакового размера вновь контролировалась на стерильность и партия допускалась к использованию только в том случае, если все единицы второй выборочной пробы оказались стерильными (ср. кривую B с кривой C рис. 38). Относящаяся к контролю C кривая прежде всего при высоких степенях контаминирования приближается к кривой A, и наконец эти кривые сливаются.

В результате повторной проверки недостаток, который имеет контроль B (по сравнению с контролем A) для партий с высокой степенью контаминирования, практически полностью ликвидируется.

Из рис. 38 следует, что если уж контроль стерильности можно повторять, то число нестерильных единиц, допускаемых в первой выборочной пробе, имеет второстепенное значение; между обоими крайними типами контроля B (первая выборочная проба может содержать максимально одну нестерильную единицу и все единицы первой выборочной пробы могут быть нестерильными) имеется лишь сравнительно небольшое различие в отношении вероятности заключения о пригодности нестерильных партий.

В соответствии с этим суть таких типов контроля состоит в повторении контроля и требовании того, чтобы вся выборочная проба была стерильной.

При типах контроля, которые допускают повторение

испытания, если первая выборочная проба оказалась контаминированной, вероятность заключения о пригодности нестерильной партии еще больше может приближаться к таковой для типа контроля *A* (рис. 39). Если вторая выборочная проба в 2 раза больше первой, различие по вероятности заключения о пригодности несте-

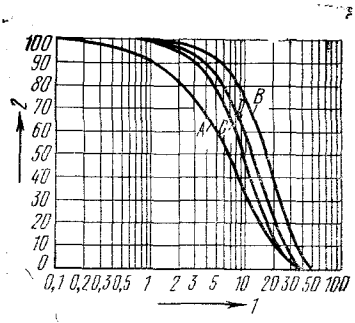


Рис. 38. Отношение между вероятностью заключения о пригодности нестерильных партий и их степенью контаминирования для контроля *A*, контроля *B*, контроля *C* и *D*. Кривые действительны для размера выборочной пробы $n=10$:

1 и *2* — то же, что на рис. 35.

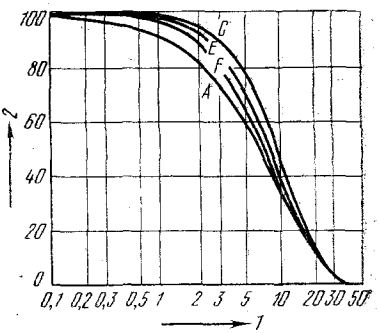


Рис. 39. Соотношение между вероятностью заключения о пригодности нестерильных партий и их степенью контаминирования для контроля *A* (вся выборочная проба должна быть стерильной) и типов контроля, при которых возможна повторная проверка с простым (*C*), двукратным (*E*) и четырехкратным (*F*) размером выборочной пробы, если первая выборочная проба содержит нестерильную единицу; кривые действительны для размера выборочной пробы $n=10$:

1 и *2* — то же, что на рис. 35.

рильных партий между «строгим» типом контроля (не разрешается повторная проверка и вся выборочная проба должна быть стерильной) и контролем, который допускает повторение испытания (если одна единица выборочной пробы оказалась нестерильной), ничтожно. Для практики оно не имеет значения.

10.4. Вероятность отбраковки стерильных партий вследствие чужеродного контаминирования выборочной пробы

Как показывают расчеты [134, 137], вероятность идентификации нестерильной партии на основании выборочной пробы тем выше, чем больше последняя. Вероятность того, что партия контаминирована лишь незначительно, тем выше, чем больше выборочная проба, которая должна оказаться стерильной. Для того, чтобы выпустить партию продукции, не содержащую с большой вероятностью нестерильные единицы, необходимо проконтролировать на стерильность по возможности большую выборочную пробу.

Таким образом, если с теоретической точки зрения желательно было бы контролировать большие выборочные пробы, на практике все же следует всегда учитывать опасность контаминирования партии посторонней микрофлорой.

Контроль стерильности даже в самом благоприятном случае дает информацию *лишь о том, была ли* выборочная проба стерильной или нет. Он ничего не говорит о происхождении обнаруженных микроорганизмов. Однако в действительности часто имеют дело с микроорганизмами, которые попали в исследуемый материал во время отбора пробы или во время ее обработки в микробиологической лаборатории.

Частота выборочных проб, контаминированных микроорганизмами, источником которых является исследуемый материал. Частоты контаминирования, приведенные в различных литературных источниках, широко варьируют: чаще 1,0—0,01%, т. е. на 10^2—10^4 исследованных проб приходится одна проба, загрязненная микроорганизмами, источником которых является исследуемый материал. Частота контаминирования, например $1 : 10^3$, или 0,1%, может показаться незначительной, однако не следует забывать, что партия, как правило, должна считаться нестерильной, если нестерильной была хотя бы одна единица выборочной пробы. Если в качестве выборочной пробы исследуют 10 ед., то при частоте контаминирования, равной $1 : 10^3$, 1% всей выборочной пробы содержит по крайней мере одну нестерильную единицу, обусловленную контаминированием, т. е.

1% всех стерильных партий в этом случае был бы ошибочно объявлен нестерильным. Для выборочной пробы из 20 ед. может быть забраковано уже 2% пригодных партий, из 100 ед. — 9,5% и т. д.:

$$P' = 1 - (1 - p')^n, \qquad (209)$$

где P' — частота выборочных проб, которые содержат по крайней мере одну нестерильную единицу, обусловленную контаминированием; p' — частота контаминирования при проведении контроля стерильности; n — размер выборочной пробы.

Легко показать, что для завода средней мощности, получающего по 10 сливов культуральной жидкости в сутки из ферментеров вместимостью 63 м³, даже при ошибке 1% в месяц будет отбраковываться 3 слива, а неоправданные убытки составят более 10 тыс. руб. Количество отбраковываемых фактически стерильных партий для степени контаминирования 1,0—0,01% в зависимости от величины выборочной пробы можно оценить по графикам, представленным на рис. 40.

Если принять степень контаминирования 0,01%, а долю ошибочно объявленных нестерильными партий 10%, то по рис. 40 находим размер выборочной пробы 1000 ед. При изменении степени контаминирования до 0,02% размер выборочной пробы составит 500 ед. Решим обратную задачу. Пусть при степени контаминирования 0,04% исследуется 500 ед. Находим, что в этом случае могут быть ошибочно объявлены нестерильными примерно 20% партий.

Вероятность отбраковки стерильных партий при различном типе контроля. На рис. 41 для различных типов контроля графически показаны вероятности отбраковки стерильных партий в зависимости от размера выборочной пробы. В основу расчетов положена частота контаминирования, равная 1%. Общая оценка типов контроля приведена в табл. 38. При более низкой частоте контаминирования семейство кривых сдвигалось бы параллельно абсциссе к более высоким значениям n. Величина смещения определяется отношением соответствующей частоты контаминирования к выбранному в данном случае значению — 1%.

При построении графика использован логарифмический масштаб.

Как и следовало ожидать, частота отбраковки стерильных партий при «строгом» методе контроля максимальная, а при методе B — минимальная. Из рис. 41

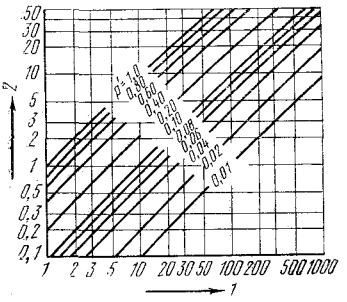


Рис. 40. Частота выборочных проб, которые содержат, по крайней мере, одну нестерильную единицу, обусловленную чужеродным контаминированием (P'), в зависимости от степени контаминирования (p') и размера выборочной пробы (n):

1 — размер выборочной пробы; *2* — частота контаминированных проб (в %).

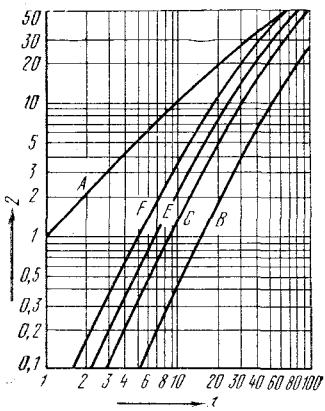


Рис. 41. Вероятность отклонения стерильных партий (частота выборочных проб, которые контаминируются микроорганизмами, происходящими не из исследуемого материала) при типах контроля A, B, C, E и F в зависимости от размера выборочной пробы (n).

В основу расчетов положена частота чужеродного контаминирования $p'=1\%$; *1* и *2* — то же, что на рис. 40.

видно, что частота отбраковки стерильных партий зависит не только от типа контроля, но и от размера выборочной пробы. При переходе от контроля A к контролю B при $n=10$ вероятность отбраковки снижается с 9,5 до 0,4% ($\sim 1/20$), однако при $n=50$ — лишь с 40 до 9% ($\sim 1/4$). То же действительно для контроля типов C, E и F, однако преимущество снижения вероятности исключения стерильных партий с увеличением размера выборочной пробы сводится на нет скорее, чем при контроле B. При $n=100$ ($p'=1\%$) контроль типов C, E и F почти такой же «строгий», как и контроль A. Кривые рис. 41 показывают также, что в случае $p'=1\%$ и $n=10$

Таблица 38. **Типы контроля**

Тип контроля	Вероятность вывода о пригодности нестерильной партии	Размер выборочной пробы		Результат контроля	Количество нестерильных единиц в выборочной пробе	Решение
		1-й контроль	2-й контроль			
A	P_A или P_0	*n*	—	Все единицы стерильные	0	Партию считают стерильной
				Одна или несколько единиц нестерильные	$\geqslant 1$	Партию отклоняют
B	P_B	*n*	—	Все единицы стерильные	0	Партию считают пригодной
				Одна единица нестерильная	1	Партию отклоняют
				Нестерильных единиц более одной	>1	Партию считают стерильной
C	P_C	*n*	*n*	1-й контроль. Все единицы стерильные.	0	Контроль повторяют
				Одна единица нестерильная	1	Партию отклоняют
				Нестерильных единиц более одной	>1	Партию объявляют стерильной
				2-й контроль. Все единицы стерильные	0	Партию отклоняют
				Одна или несколько единиц нестерильные	$\geqslant 1$	Партию считают стерильной
D	P_D	*n*	*n*	1-й контроль. Все единицы стерильные	0	Контроль повторяют
				Одна или несколько единиц нестерильные	$\geqslant 1$	Партию считают стерильной
				2-й контроль. Все единицы стерильные	0	Партию отклоняют
				Одна или несколько единиц нестерильные	$\geqslant 1$	

Продолжение табл. 38

Тип контроля	Вероятность вывода о пригодности нестерильной партии	Размер выборочной пробы		Результат контроля	Количество нестерильных единиц в выборочной пробе	Решение
		1-й контроль	2-й контроль			
E	P_E	n	$2n$	Все единицы стерильные	0	Партию объявляют стерильной
				Одна единица нестерильная	1	Контроль повторяется с выборочной пробой размером, увеличенным в 2 раза
				Нестерильных единиц более одной	>1	Партию отклоняют
				2-й контроль. Все единицы стерильные	0	Партию объявляют стерильной
				Одна или несколько единиц нестерильные	>1	Партию отклоняют
F	P_F	n	$4n$	1-й контроль. Все единицы стерильные	0	Партию считают стерильной
				Одна единица нестерильная	1	Контроль повторяют с выборочной пробой размером, увеличенным в 4 раза
				Нестерильных единиц более одной	>1	Партию отклоняют
				2-й контроль. Все единицы стерильные	0	Партию считают стерильной
				Одна или несколько единиц нестерильные	$\geqslant 1$	Партию отклоняют

вероятность отбраковки стерильных партий при контроле C, D, E и F, как правило, составляет еще больше 1%.

Только на этом основании микробиологические лаборатории должны стремиться поддерживать частоту контаминирования на уровне ниже 1%. Еще раз следует подчеркнуть, что при частоте контаминирования 1% и применении типа контроля A в среднем каждая десятая стерильная партия будет объявляться нестерильной из-за контаминации.

Смысл и цель контроля типов B, C, D, E и F состоят в уменьшении опасности необоснованной отбраковки фактически стерильной партии вследствие контаминирования. Однако это преимущество нельзя рассматривать изолированно. Следует принимать во внимание и вытекающее отсюда изменение вероятности принятия в качестве пригодных действительно нестерильных партий. В случае одинакового размера выборочной пробы при переходе от контроля A к контролю B, C, D, E и F вероятность отбраковки стерильной пробы снижается, однако одновременно(как показано выше) возрастает вероятность принятия нестерильных партий. Как видно из рис. 41, при одинаковой вероятности отбраковки стерильной партии размер выборочной пробы при типах контроля B, C, D, E и F в некоторых случаях может быть значительно больше, чем при контроле A. При вероятности, равной 1%, размер выборочной пробы при контроле F может быть в 5 раз больше, чем при контроле A; при контроле B и C — больше примерно в 15 и 9 раз соответственно.

С математической точки зрения рассмотренные соотношения сравнительно понятны, поскольку вероятность отклонения стерильной партии вследствие контаминирования (P') и вероятность принятия нестерильной партии (P) вычисляются по сходным формулам, причем $P'=1-P$; P в одном случае (P) следует понимать как степень контаминирования партии, а в другом (P') — как частоту контаминирования во время отбора проб и контроля стерильности (p'). При одинаковом P' (и соответственно различном n) представленные на рис. 37 и 38 для различных контрольных методов кривые параллельно абсциссе приближаются друг к другу настолько, что пересекаются при значении P, которое

количественно равно $1-P$ или $100-100\ P'$ при использовании процентных значений (см. рис. 40).

Для всех степеней контаминирования, которые на рис. 42 находятся справа от точки пересечения, вероят-

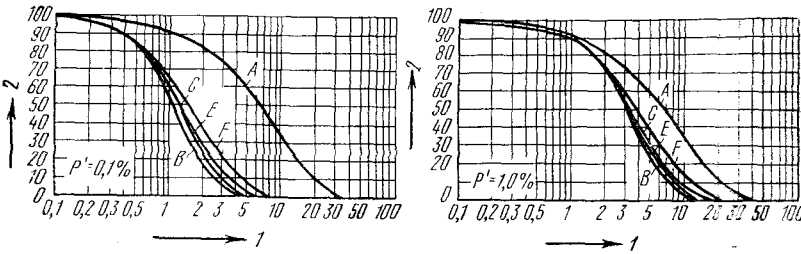


Рис. 42. Вероятность заключения о пригодности нестерильных партий для типов контроля *A*, *B*, *C*, *E* и *F* при одинаковой частоте отклонения стерильных партий вследствие чужеродного контаминирования.

В основу расчета левого семейства кривых положена частота чужеродного контаминирования $p=0{,}1\%$ и частота отклонения стерильных партий 1%; выборочные пробы для различных порядков контроля следующие: $n_A=10$, $n_B=149$, $n_C=86$, $n_E=67$, $n_F=50$. *1* — степень контаминирования партии (в %); *2* — вероятность заключения о пригодности (в %).

В основу расчета правого семейства кривых положена частота чужеродного контаминирования $p'=1\%$ и частота отклонения стерильных партий 10%; размер выборочной пробы (n) для различных типов контроля различен и составляет $nA=10$, $n_B=53$, $n_C=31$, $n_E=24$, $n_F=19$ (сравн. с рис. 41).

ность принятия нестерильных партий при контроле типов *B*, *C*, *E* и *F* даже ниже, чем при контроле *A*. Это преимущество, которое следует еще раз подчеркнуть, должно достигаться с помощью соответственно бóльшей выборочной пробы (см. пояснение к рис. 42). Поскольку на практике постоянно требуется, чтобы вероятность отклонения стерильных партий была по возможности незначительной, точка пересечения кривых будет постоянно находиться в области сравнительно низких степеней контаминирования. При методах контроля *B*, *C*, *E*, *F* вероятность принятия контаминированных партий будет повышаться лишь в ничтожном, не имеющем для практики значения размере, и только для партий с незначительной степенью контаминирования. При соответствующем определении размера выборочной пробы методы контроля *B*, *C*, *E* и *F* вполне отвечают требованию как микробиологических производств (по возможности

незначительная вероятность отбраковки фактически стерильных партий), так и потребителей продукции этих производств (по возможности незначительная вероятность принятия нестерильных партий).

* *
*

Даже самый тщательный контроль стерильности не может исключить определенной вероятности принятия нестерильных партий. Насколько велика эта вероятность, зависит как от степени контаминирования партии, так и от размера выборочной пробы и метода контроля. Контроль, который допускает повторную проверку, если в исследуемой выборочной пробе не все единицы были стерильными, для практики и по существу безусловно не хуже, чем контроль, при котором уже в первой выборочной пробе все единицы должны быть стерильными. Здесь также решающим фактором является размер выборочной пробы, прежде всего размер первой выборочной пробы. Если размер выборочной пробы соответственно большой, то при методах контроля, которые допускают повторную проверку, для партий определенных степеней контаминирования вероятности заключения о пригодности могут быть более незначительные, чем при «строгом» контроле.

Потребители продукции многих микробиологических производств в первую очередь заинтересованы в получении продукта, который с наибольшей вероятностью не содержал бы посторонней микрофлоры. Работники заводов заинтересованы в том, чтобы партии полупродуктов и конечных продуктов как можно реже ошибочно признавались некондиционными из-за контаминирования. Чтобы умело сочетать эти тесно связанные требования, специалисты, осуществляющие контроль в микробиологических лабораториях, технологи и аппаратчики должны частоту контаминирования поддерживать на низком уровне за счет высокой эффективности всех операций. Очевидно, что контрольная микробиологическая лаборатория занимает в этом плане особое положение. При гарантированных асептических условиях работы чем меньше частота контаминирования, тем больше может быть выборочная проба. При высокой

культуре работы меньше вероятность больших потерь из-за ошибочного заключения о нестерильности партий и меньше вероятность принятия нестерильной партии.

11. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОЦЕССОВ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ ПОЛУЧЕНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ

11.1. Микробиологические индикаторы

В работах [155, 156] представлен обзор по микробиологическим индикаторам стерилизации, а также принципам контроля эффективности различных режимов и методов стерилизации с помощью микробиологических индикаторов. Проведено сравнение различных результатов, полученных при контроле с помощью микробиологических индикаторов и контроле деконтаминированного продукта на стерильность. Резистентность микробиологических индикаторов предлагают характеризовать не продолжительностью воздействия или дозой стерилизующего агента, при которых на всех исследованных индикаторах более не могут обнаруживаться выжившие микроорганизмы, а путем тех самых периодов воздействия или доз, при которых на 50 и 99% индикаторов более не обнаруживаются выжившие микроорганизмы. Обсуждаются особенности контроля стерилизации паром, сухим жаром, окисью этилена и облучением с помощью микробиологических индикаторов стерилизации. Полученные данные позволяют подтвердить ранее сделанный вывод о том, что на практике методы стерилизации чаще всего не могут выполнить требование об освобождении объектов от всех способных к размножению микроорганизмов. Стерилизация приводит лишь к получению объектов, которые с определенной, чаще всего большой, вероятностью не содержат посторонних микроорганизмов, представляющих опасность для процессов или продуктов.

Общие свойства микробиологических индикаторов. Под микробиологическими индикаторами следует понимать объекты с находящимися на них микроорганизмами. Эти объекты вместе с конкретным материалом подвергают стерилизации и затем исследуют на наличие

еще способных к размножению микроорганизмов. Следовательно, с помощью микробиологических индикаторов изучают вопрос, достиг ли метод на известном по своим свойствам объекте определенного действия. Показателем эффективности этого действия является такое повреждение бактерий, которое снижает их способность к размножению при определенных условиях культивирования. Поскольку, с одной стороны, методы стерилизации отличаются исключительным разнообразием летальных факторов и параметров и, с другой, один и тот же вид бактерий не обладает достаточно высокой резистентностью ко всем внешним воздействиям, то можно предположить, что, по-видимому, один и тот же индикатор вряд ли может применяться для контроля всех методов.

Применение биологического индикатора дает общий эффект, который является результатом одновременного или последовательного воздействия отдельных факторов, которые в зависимости от ситуации могут взаимно заменяться. Выбор конкретных методов, способов и режимов стерилизации является одним из важных направлений в микробиологической технологии. Полагают [155], что именно микробиологические индикаторы в наибольшей степени пригодны для контроля эффективности режимов стерилизации. Отмечаются и определенные их недостатки, несколько ограничивающие использование этих индикаторов и заставляющие исследователей разрабатывать новые, более совершенные методы контроля. К таким недостаткам относятся: инерционность, поскольку результат измерения можно получить самое раннее через 24 ч, а в некоторых случаях только через 14 дней; неустойчивость — индикаторы лишь ограниченно устойчивы, предельный срок хранения не больше года; неэкономичность — изготовление, контроль и исследование индикаторов сравнительно дороги и требуют много ручных операций.

Однако существует мнение, что биологические тест-объекты ни в коем случае не должны заменяться [155]. Их значение определяется количеством и видом факторов, которые способствуют стерилизации, и различным соотношением в стерилизуемом объеме, а также в стерилизуемом материале. Предполагают, что скорее всего можно будет отказаться от микробиологических ин-

дикаторов при стерилизации облучением. В то же время при стерилизации окисью этилена отказ от таких индикаторов не представляется возможным.

Определение резистентности микробиологических индикаторов. При обычном методе определения времени гибели и резистентности индикаторов некоторое, чаще всего небольшое, количество тест-объектов стерилизуют до тех пор, пока все они не станут стерильными. Этот метод вопреки его названию недостаточно точен, так как продолжительность периода гибели варьирует от опыта к опыту и одновременно зависит от количества исследованных индикаторов.

Например, если исследуют лишь одну индикаторную полоску, то она стерильна при средней концентрации выживших микроорганизмов на тест-объект $N=0{,}1$ с вероятностью 90%. Если исследуют две полоски, то вероятность того, что обе они стерильны, составляет 90% лишь при $N=0{,}053$ (следовательно, лишь после более продолжительного воздействия стерилизующего агента). Чем точнее стремятся определить так называемый период гибели, тем выше становится его численное значение.

Используя данные, полученные при вычислении вероятности, удалось более точно, чем это было сделано ранее, охарактеризовать так называемую резистентность микробиологических индикаторов [155, 156]. Она определяется продолжительностью воздействия, которая необходима, чтобы простерилизовать определенный процент (целесообразнее 50%) тест-объектов. Учитывая это, для микробиологических лабораторий можно дать некоторые практические рекомендации. Например, для нескольких периодов воздействия процент стерильных индикаторов нужно определять возможно точнее. Для уточнения существующих методов количество исследуемых тест-объектов должно значительно повышаться, а период воздействия должен обеспечивать стерилизацию 50% тест-объектов. Основная масса точек измерения должна быть расположена по возможности симметрично по обе стороны от точки, обозначающей 50%-ную величину. Если величины в процентах, установленные для периодов воздействия различной продолжительности, нанести на график с подходящим мас-

штабом вероятности, то в идеальном случае получают прямую линию. Используя ее, путем интерполяции можно установить такую продолжительность воздействия, при которой 50% индикаторов являются стерильными.

Резистентность и период гибели микроорганизмов-индикаторов эффективности стерилизации. Время гибели микроорганизмов-индикаторов, в принципе, должно быть примерно таким же, как и период действия летального фактора, необходимый собственно для стерилизации. Поэтому при приготовлении биологических индикаторов постоянно возникает вопрос, каковы продолжительность воздействия, которую выдерживает индикатор, и его интенсивность. Остановимся на важнейших параметрах, которые должны рассматриваться при определении необходимой продолжительности воздействия и его интенсивности или дозы.

Вид микроорганизма. Скорость, с какой уменьшается количество способных к размножению микроорганизмов популяции под действием стерилизующего агента, зависит от вида микроорганизма, поэтому различают чувствительные и нечувствительные к данному стерилизующему агенту виды и штаммы. Корреляция устойчивости к различным агентам отсутствует. Микроорганизм, резистентный к пару под давлением, может быть чувствительным к горячему воздуху, а чувствительный к нагреванию может быть резистентным к гамма-лучам.

Состояние микроорганизмов. Известно, что бактериальные споры более резистентны, чем вегетативные клетки. Однако это правило недействительно для стерилизации облучением и, очевидно, для стерилизации окисью этилена. Устойчивость зависит также от условий, в которых получены микроорганизмы, т. е. от состава питательной среды, температуры культивирования, интенсивности аэрации и перемешивания, наличия ингибиторов роста, микроэлементов и др.

Количество микроорганизмов. Чем больше микроорганизмов на стерилизуемом объекте, тем длительнее период стерилизации до достижения минимально допустимой концентрации микроорганизмов. Этот вопрос рассматривался в разделе 3.

Внешние факторы. Эффективность действия бактерицидного агента значительно снижается под влия-

нием субстанций, которые окружают микроорганизмы: пленки ПАВ и белковых веществ, комки и др. Особенно отрицательно их влияние при стерилизации окисью этилена, при которой доступ деконтаминанта непосредственно к клеткам затруднен. Устойчивость микроорганизмов зависит от микроклиматических условий, прежде всего относительной влажности и парциального давления, а также от типа газов.

Перечисленные факторы определяют так называемую резистентность популяции. Продолжительность экспонирования, необходимая для преодоления их действия, может экспериментально определяться на характерных пробах «естественно» контаминированного материала. Она зависит от концентрации микроорганизмов в сыром материале, метода приготовления, асептики техники приготовления и подготовки продукта к стерилизации (очистка).

Продолжительность действия, необходимую для стерилизации продукта и определяемую при контроле на стерильность, на практике часто увеличивают.

Крутизна кривой выживаемости. Чем более пологая кривая выживаемости, тем медленнее снижается количество микроорганизмов в ходе стерилизации и тем позже достигается их минимально допустимая концентрация.

Вид, цель применения и значение объекта. Если не исключена возможность дальнейшего роста выживших микроорганизмов на (или в) стерилизуемом объекте, то интервал надежности должен быть вообще больше, чем в случаях, когда количество выживших микроорганизмов не может увеличиваться (инструменты, приборы). Большое значение имеют условия хранения (температура, продолжительность). Следует учитывать гарантируемую эффективность стерилизации продукта. В зависимости от назначения объекта некоторые виды микроорганизмов иногда можно не учитывать.

Экономичность метода. Часто, когда практически можно было бы выбрать любую интенсивность стерилизации, в целях экономии от этого отказываются. Это относится, например, к стерилизации питательных сред в производстве дрожжей и бутанола. Расходы, считающиеся необходимыми, в зависимости от обстоя-

тельств должны быть оправданы экономикой производства.

Интервал надежности должен быть тем больше, чем неравномернее контаминирован стерилизуемый материал. Для определения необходимой продолжительности воздействия при различных методах и задачах упомянутые параметры имеют различное значение. В целом интервал надежности должен быть как можно больше. При разнообразии методов и задач не следует рассчитывать на то, что для всех целей будет приемлемым единственный тип индикатора. Это предполагает необходимость точного знания области применения индикатора и поддержания условий, положенных в основу измерения. Требуется, в частности, обращать внимание на состояние продукта перед стерилизацией и соответствующим образом контролировать сохранение условий, приемлемых для измерения.

Чистые культуры микроорганизмов в качестве индикаторов эффективности стерилизации. Отмечается [155], что наряду с естественными популяциями применяют микробиологические индикаторы стерилизации, которые готовят с помощью чистых культур. Это высушенные на фильтровальной бумаге, волокне, стекле, песке или алюминиевой фольге бактериальные суспензии, частично в комбинации с лиофилизированной или готовой к употреблению питательной средой, а также с химическим индикатором. Последний в определенных условиях должен показывать, действовал ли бактерицидный агент на тест-объект. В других случаях химический индикатор должен облегчать оценку контроля стерильности микробиологических индикаторов; изменяя цвет, он выявляет рост выживших микроорганизмов на питательной среде. Иногда в качестве биологического индикатора рекомендуют использовать споры, суспендированные непосредственно в культуральной жидкости. Однако следует подчеркнуть, что несмотря на многообразие различных форм индикаторов, ни один из них в полной мере не отвечает всем требованиям.

Чистые культуры имеют то преимущество, что можно более или менее активно регулировать резистентность тест-объектов путем изменения условий культивирования и приготовления. Знание внешних факторов, от которых зависит резистентность микроорганизма, прино-

сит, таким образом, двойную пользу: дает возможность, с одной стороны, исключить или перевести в менее резистентное состояние высокорезистентные формы, а с другой, приготовить тест-объекты с необходимой резистентностью. В принципе, можно приготовить очень много вариантов индикаторов за счет варьирования состояния и свойств бактерионосителя, суспендирующей среды, степени высушивания и др. Однако во всех случаях исключительную роль в обнаружении оставшихся жизнеспособных клеток микроорганизмов-индикаторов играют состав и свойства индикаторной питательной среды.

Чистые культуры позволяют определять количественные характеристики эффективности режимов стерилизации путем подсчета оставшихся жизнеспособных микроорганизмов. При этом построенная на основании результатов специальных опытов кривая выживаемости может выполнять функцию калибровочной кривой. Из отношения исходного количества микроорганизмов к количеству выживших к определенному моменту времени можно определять эффективность метода.

Имеющийся опыт показывает, что для изготовления биологических индикаторов следует применять микроорганизмы, легко обнаруживаемые обычными микробиологическими методами. С этой точки зрения анаэробные микроорганизмы, по-видимому, менее пригодны, чем аэробные, а из последних предпочтение следует отдать тем, которые могут расти на простых субстратах. При выборе штамма необходимо обращать особое внимание на сохранение постоянства терморезистентности как от партии к партии, так и во время хранения. Чистые культуры почти всегда не удовлетворяют этому требованию. Бактериальный штамм должен легко идентифицироваться и отличаться каким-либо типичным признаком от микроорганизмов, обычно появляющихся в научно-исследовательской лаборатории в качестве контаминантов.

Сравнение накопленных экспериментальных данных показывает, что у микроорганизмов отсутствует корреляция между относительной резистентностью к горячему воздуху, пару под давлением, ионизирующему облучению и к окиси этилена. Поэтому чистые культуры имеют недостаток, исключающий возможность приме-

нения одного и того же штамма для различных бактерицидных агентов.

Стерилизация водяным паром и микробиологические индикаторы. При паровой стерилизации стерилизуемый объект нагревается в атмосфере, насыщенной водяным паром. Пар должен быть свободен от воздуха, присутствие которого затрудняет прогревание материалов, особенно пористых.

Как отмечалось, при наличии воздуха изменяется корреляция между температурой и давлением, что приводит к невозможности использовать манометр для регулирования стерилизации. Смесь пара и воздуха обладает более низкой теплоемкостью, чем чистый пар при тех же температуре и давлении, поэтому затрудняется доступ тепла к стерилизуемому материалу. Благодаря различной относительной плотности воздуха и водяного пара в камере однородная газовая смесь не образуется.

Биологические тест-объекты паровой стерилизации, кроме реагирования на температуру, должны указывать на наличие пара. Для этого можно использовать свойство спор быть значительно более резистентными к горячему воздуху, чем к пару при той же температуре. Поскольку индикаторы должны указывать на наличие пара, они должны находиться в прямом контакте с существующей в стерилизующей камере атмосферой. Применение споровых суспензий в запаянных ампулах чаще всего неправильно и только тогда допустимо, когда надежность метода стерилизации не зависит от включения воздуха в паровую фазу.

Из чистых культур для паровой стерилизации особенно пригодны Bac. stearothermophilus, они обладают высокой устойчивостью и не разрушаются при приготовлении индикаторов. Определенные трудности возникают из-за сравнительно быстрого снижения резистентности во время хранения тест-объектов. Причина низкой устойчивости заключается в тепловом активировании спор во время приготовления суспензии. Для микробиологической лаборатории применение Bac. stearothermophilus в качестве исследуемого микроорганизма влечет за собой определенные дополнительные расходы. Культуры нужно инкубировать при 50—60° С.

Микробиологические индикаторы задерживающей

способности фильтров для стерилизации воздуха. В настоящее время микробиологические индикаторы широко применяют в практике микробиологических производств при оценке задерживающей способности различных технических устройств. Примером могут служить методики проверки фильтров, предназначенных для стерилизации воздуха, с помощью культуры Bact. prodigiosum [19], спор Bac. subtilis и бактериофага.

Проверку фильтров по аэрозолю Bact. prodigiosum можно проводить как на стенде, так и непосредственно на месте установки фильтра в аппаратурно-технологической схеме. В этом случае коэффициент проскока рассчитывают по формуле

$$K_{\text{п}} = x/x_0 \cdot 100. \qquad (210)$$

Концентрацию тест-микробов до фильтра (x_0) определяют из выражения

$$x_0 = N_{\text{к}} m' 10^5/(\tau_{\text{от}} V_{\text{от}}), \qquad (211)$$

где $N_{\text{к}}$ — среднее число колоний, выросших на чашках Петри при посеве по 0,1 мл из разведения m'; m' — степень разведения сорбирующей жидкости, взятой из прибора, в который отбирали пробы воздуха; $\tau_{\text{от}}$ — продолжительность отбора проб воздуха; $V_{\text{от}}$ — объемная скорость отбора проб воздуха.

Концентрацию клеток тест-микроба в воздухе за проверяемым фильтром определяют из соотношения

$$x = 2N'_{\text{к}} \cdot 10^3/V_{\text{от}}, \qquad (212)$$

где $N'_{\text{к}}$ — число колоний тест-микроба, определенных на мембранном фильтре при фильтрации 5 мл сорбирующей жидкости.

Непременным условием успешного испытания фильтров является создание в воздухе перед ними достаточно высокой концентрации тест-микроба. Например, эффективная проверка задерживающей способности фильтров тонкой очистки воздуха возможна при создании в воздуховоде перед фильтром концентраций тест-микроба не ниже 10^7—10^8 клеток на 1 м^3. При обычных стендовых испытаниях фильтров, а также испытаниях их непосредственно в системах очистки воздуха подобная концентрация создается при распылении микробной суспензии с концентрацией $5 \cdot 10^9$ клеток в 1 мл.

11.2. Физические методы

Особенности применения. Физические методы широко применяются в микробиологической промышленности при контроле эффективности процессов получения чистых культур микроорганизмов. Измерение температуры наряду с измерениями других физических величин постоянно используют как в исследовательских лабораториях (при количественной оценке эффективности режимов термической стерилизации), так и на производстве при обеспечении стерильности аппаратов и коммуникаций, а также различных жидкостей. При измерении и автоматическом регулировании температуры стерилизуемых жидкостей (питательные среды, растворы сахаров, пеногасители) в основном применяют так называемые контактные методы, при которых чувствительный элемент измерителя (термопара, термометр сопротивления, жидкостный стеклянный термометр) находится в непосредственном контакте с контролируемой средой.

По некоторым причинам температура чувствительного элемента термоприемника отличается от истинной температуры среды [94]. Среди многочисленных факторов, непосредственно влияющих на точность измерения нестационарных температур, особое значение имеет тепловая и механическая инерция измерительного прибора. Механическая инерция определяется в основном передаточным и регистрирующим звеньями прибора. Тепловая инерция зависит от свойств термоприемника и проявляется в том, что термоприемник не успевает мгновенно следить за температурой среды, в которой он находится.

Отмеченные особенности характерны для всех приборов, используемых в микробиологической промышленности при контроле процессов термической стерилизации. Важно иметь в виду, что при непрерывном способе стерилизации точность измерения температур, механической и тепловой инерции приборов приобретает первостепенное значение из-за незначительного времени выдержки. Это замечание относится как к экспериментальным, так и промышленным установкам непрерывной стерилизации. Недооценка погрешностей измерения температур приведет к неправильной количественной

характеристике эффективности режимов стерилизации, а как следствие — к получению контаминированных жидкостей нестандартного состава при переносе режимов на установки большей производительности.

Физические методы часто используют и при оценке герметичности аппаратов и коммуникаций, работающих в асептических условиях. Еще находят применение методы грубой оценки эффективности герметизации по падению давления, контролируемому с помощью манометров и вакуумметров.

Однако из известных методов проверки герметичности для микробиологической промышленности подходят лишь такие, которые не только обнаруживают скорость натекания меньшую, чем допустимая, но и позволяют найти места натекания. Последнее требование должно исключать применение так называемых интегральных методов (по падению разрежения или давления), позволяющих фиксировать лишь сам факт наличия неплотности без указания ее расположения.

До сих пор на микробиологических производствах широко распространен метод пневматического испытания на герметичность с применением в качестве индикатора мыльной эмульсии. Метод достаточно прост, однако имеет недостатки, значительно сужающие возможности его практического применения. Например, требуемая степень герметичности может быть проверена лишь при избыточном давлении, превышающем рабочее давление ферментаторов [90], достигающее не более 0,4 МПа. Практически невозможно обнаружить неплотности при повышенных температурах поверхностей (например, после стерилизации и последующего охлаждения даже до 30° С верхняя часть аппарата со штуцерами и коммуникациями имеет температуру до 70—80° С). При этом методе нельзя обнаружить мыльные пузыри в местах, осмотр которых затруднен.

Наиболее удобен и надежен метод проверки герметичности с помощью галоидных течеискателей различного типа (ГТИ, ВАГТИ, БГТИ и др.). Галоидсодержащее вещество, имеющее достаточно высокую упругость паров (обычно четыреххлористый углерод или фреон-12), заливают в проверяемый аппарат, в котором затем создают избыточное давление. Пары этого вещества проникают через неплотности, а щупы указанных

выше приборов позволяют обнаружить утечки до 0,5 г в год, что эквивалентно скорости натекания 25—50 л в год или $2{,}85—5{,}7 \cdot 10^{-6}$ м³/ч. Как показывает опыт работы некоторых заводов, метод прост и гарантирует при отсутствии пропусков достижение эффективной герметизации аппаратов, трубопроводов и арматуры.

Проверка арматуры. Герметичность запорного устройства арматуры проверяют на стенде (рис. 43). Снятую с трубопроводов арматуру осматривают, видимые дефекты устраняют. После этого ее устанавливают на переходной штуцер при закрытом устройстве клапан — седло. Из бачка-испарителя продувают паровоздушную смесь галоидсодержащего вещества через штуцер с выводом резинового шланга из помещения. После продувки (1—2 мин) вентиль на штуцере закрывают и в системе создают давление 0,2—0,22 МПа. Давление и температуру контролируют по манометру и термометру, установленным на бачке-испарителе. Щуп течеискателя находится у открытого патрубка испытуемого вентиля.

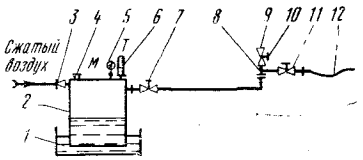


Рис. 43. Схема стенда для испытания арматуры на герметичность:

1 — ванна для подогрева бачка-испарителя; *2* — корпус бачка-испарителя; *3* — запорный вентиль на подводе сжатого воздуха; *4* — штуцер для залива галоидсодержащего вещества; *5* — манометр; *6* — термометр; *7* — запорный вентиль; *8* — переходная катушка для арматуры различных диаметров; *9* — щуп течеискателя при проверке герметичности уплотнения клапан—седло; *10* — испытуемый вентиль; *11* — продувочный штуцер с запорным вентилем; *12* — резиновый шланг, выводимый из помещения при продувке.

Запорное устройство вентиля считают герметичным, если при проверке не отмечают отклонений стрелки прибора от нуля и учащения звуковых сигналов в наушниках на диапазоне чувствительной настройки ГТИ. Помещение для стенда должно быть хорошо вентилируемым.

Проверка аппаратов. До проверки на герметичность внутреннюю полость аппарата нужно вымыть и просушить. Галоидсодержащее вещество заливают в аппарат, если последний имеет нагревательные элементы (паровая рубашка или змеевик). После введения галоидсодержащего вещества аппарат подогревают до 80° С

и поддавливают сжатым воздухом до 0,2—0,22 МПа. Если аппарат не имеет нагревательных элементов, то пары галоидсодержащих веществ подают из сварного бачка-испарителя (см. рис. 43) вместимостью около 2 л с двумя штуцерами под резиновую трубку с условным диаметром 10 мм. В бачке поддерживают температуру 80° С с помощью водяной бани и парового обогрева.

Один из штуцеров бачка соединяют резиновой трубкой с полостью аппарата. Через второй штуцер в бачок подают сжатый воздух, с помощью которого и передавливают пары галоидсодержащего вещества в полость аппарата. Количество галоидсодержащего вещества, вводимое в аппарат, рассчитывают, исходя из необходимости создания в его полости объемной концентрации не менее 10 мл/м³ в соответствии с инструкцией на прибор.

Продолжительность проверки одного аппарата, например ферментатора, не превышает, как правило, 1,5—2 ч. Особое внимание обращают на проверку герметичности фланцевых соединений, а также теплообменных устройств, расположенных внутри ферментатора.

Проверка систем аппаратов. Наиболее трудоемкой и сложной в условиях производства является проверка герметичности работающих в асептических условиях систем, включающих аппараты, трубопроводы, КИП, запорную и регулирующую арматуру. В качестве примера можно привести проверку УНС совместно с ферментатором и связывающими их коммуникациями. При хорошо отлаженном производстве такую проверку проводят не перед каждой загрузкой ферментатора, а, как правило, раз в неделю или при подозрении, что загрязнения поступили в аппарат именно из этой системы (например, при обсеменении питательной среды в ферментаторе спорами микроорганизмов).

Перед проверкой систему промывают, просушивают сжатым воздухом, а затем в один из ферментаторов заливают необходимое количество галоидсодержащего вещества. Аппарат проверяют на герметичность по методике, описанной выше, затем увеличивают в нем давление до 0,25 МПа и в течение 2—3 мин продувают пары галоидсодержащего вещества через систему, определяя наличие их на выходе системы с помощью галоидного течеискателя. После этого систему герметизи-

руют на выходе. Пары галоидсодержащего вещества, попавшие в помещение в период продувки, удаляют, как правило, через резиновый шланг в атмосферу. Помещение проветривают в течение 20—30 мин и приступают к проверке герметичности УНС, обращая особое внимание на герметичность фланцевых соединений теплообменника-охладителя. Затем проверяют всю материальную линию до загружаемого аппарата включительно.

Обнаруженные неплотности устраняют и убеждаются в эффективной герметизации соединений путем повторной проверки с помощью галоидного течеискателя. При нормальной эксплуатации УНС и квалифицированной ее сборке и подготовке к работе продолжительность проверки на герметичность не превышает $3^1/_2$ ч. Регулярные проверки систем, работающих в асептических условиях, являются хорошей гарантией поддержания необходимой эффективности герметизации всех элементов, узлов и аппаратов.

В условиях некоторых лабораторий и производств физические методы находят применение и при проверке задерживающей способности фильтров, предназначенных для стерилизации воздуха. Например, описан метод определения эффективности фильтров с помощью аэрозоля метиленового синего [61] и аэрозоля хлорида натрия [110].

11.3. Химические методы

Применяемые в некоторых лабораториях химические индикаторы, по существу, представляют собой ухудшенный вариант контроля эффективности стерилизации с помощью термометров. Химический индикатор лишь фиксирует наличие или отсутствие в данной точке стерилизуемого объема температуры, равной температуре его плавления или изменения цвета. Другой информации, необходимой для объективной оценки эффективности режима стерилизации, с помощью химических индикаторов получить невозможно. Например, нельзя учесть продолжительность поддержания определенной температуры, а также температуры, отличающейся от рабочей температуры срабатывания индикатора. Таким образом, исключается возможность получения количественных характеристик, необходимых для оценки эф-

фективности режимов стерилизации. Именно поэтому в настоящее время химические индикаторы почти не находят применения в практике микробиологических производств.

Указанное выше замечание можно в полной мере отнести и к некоторым традиционным химическим методам проверки герметичности оборудования, которые ранее часто применялись в практике (например, метод с использованием аммиака и соляной кислоты). В последние годы появились сообщения об использовании органолептических маркеров для проверки герметичности оборудования и коммуникаций. Например, предложен быстрый, экономичный и чувствительный метод обнаружения утечек в различных устройствах, предполагающий применение меркаптана [132]. Метод не требует предварительной деконтаминации оборудования и может быть использован как при положительном, так и отрицательном давлении в испытуемых замкнутых полостях.

11.4. Использование модельной питательной среды

В заводской практике для проверки эффективности тех или иных процессов, связанных с получением чистых культур микроорганизмов, часто используют модельную питательную среду, являющуюся своеобразным индикатором, который позволяет выявить постороннюю микрофлору. Очевидно, что состав такой среды должен обеспечивать возможность обнаружения всех видов микроорганизмов, опасных для данного производства. Когда предъявляют повышенные требования к чистоте полученных продуктов микробиологических производств, целесообразно, по-видимому, применять сложные и достаточно дорогие питательные среды. В то же время на многих микробиологических производствах при проверке обеспечения асептических условий в аппаратах можно использовать и простые среды, например питательные среды, содержащие кукурузный экстракт.

Одним из наиболее распространенных является метод, при котором аппарат стерилизуют, заполняют стерильной питательной средой и выдерживают ее в течение 40—60 ч при 30° С [136]. Возможен и иной вариант, когда работы начинают с оценки стерилизуемости ап-

парата или установки. Для этого в качестве индикатора используют питательную среду, стерилизуемую одновременно с оборудованием.

Выдержка питательной среды в аппарате при определенной температуре, по существу, является термостатированием при условиях, обеспечивающих рост и развитие посторонней микрофлоры, которая осталась в аппарате после его термической стерилизации или в результате проникновения контаминантов при нарушении герметичности. Возможны различные варианты данной методики. Их конкретное содержание определяется как чисто техническими причинами, так и уровнем квалификации обслуживающего персонала. Например, при недостаточной квалификации и отсутствии необходимого опыта ведения процессов в асептических условиях можно рекомендовать ступенчатый метод, предусматривающий последовательную проверку стерилизуемости аппарата и его монтажной схемы, эффективности герметизации, очистки технологического воздуха, подаваемого в аппараты. Заключительную проверку проводят при имитации режима аэробной ферментации на незасеянной питательной среде.

11.5. Комплексная оценка возможности достижения асептических условий в аппаратах

Особенности оценки. В условиях промышленного производства задача достижения и поддержания асептических условий, как правило, решается применительно не к одному аппарату, а к группе однотипных взаимосвязанных аппаратов, входящих в состав технологических систем. Например, прием, подача и стерилизация питательной среды; прием, подача и стерилизация растворов сахаров; подача, очистка и удаление воздуха. Такие системы состоят из оборудования, коммуникаций, запорной и регулирующей арматуры, КИП и средств автоматики. Они предназначены для решения специфических задач микробиологических производств, связанных, например, с обеспечением ферментаторов стерильным воздухом в необходимых количествах. При прохождении материального потока (жидкостей или газов) по такой системе посторонняя микрофлора либо уничтожается под действием какого-либо летального фак-

тора (например, при термической стерилизации в установке непрерывного действия), либо задерживается в одном или нескольких технических устройствах (например, в фильтрах тонкой очистки воздуха). Концентрация посторонней микрофлоры в потоке снижается и за счет процессов осаждения в трубопроводах, арматуре, а также по другим причинам.

Поскольку речь идет о достижении гарантированно асептических условий, то комплексный метод экспериментальной проверки должен обеспечить возможность объективной оценки того, что посторонняя микрофлора не проникает в течение заданного времени во внутренние полости аппаратов, арматуры и коммуникаций ни по одному из возможных путей, которые были рассмотрены ранее. Для обеспечения асептических условий наиболее сложную технологическую систему, несомненно, представляет ферментатор с подключенными к нему коммуникациями, арматурой и КИП. Как уже отмечалось, обеспечение асептических условий культивирования в целом возможно лишь в том случае, если каждая из соответствующих технологических систем отвечает общим требованиям по герметичности и стерилизуемости и выполняет возложенные на нее функции достаточно надежно.

Разбивка технологического оборудования микробиологических производств на такие системы, хотя в известной мере и условна, однако полезна для практики, поскольку позволяет осуществлять поэтапную проверку узлов и аппаратов, быстрее обнаруживать возможные источники поступления посторонней микрофлоры. При этом для многих микробиологических производств с помощью методов определения эффективности работы указанных технологических систем необходимо выявлять даже единичные посторонние микроорганизмы. Чувствительность существующих физических, химических и микробиологических методов еще не позволяет обнаруживать единичные микроорганизмы в больших объемах жидкостей и газов. Поэтому естественно стремление практических работников создавать на этапах проверки такие условия в аппаратах, которые бы обеспечивали рост попавшей в них посторонней микрофлоры и достижение концентраций, легко обнаруживаемых современными методами.

На некоторых заводах для достижения таких целей используют специально подобранные питательные среды, состав которых наиболее благоприятен для развития посторонней микрофлоры [42]. Эти среды, по существу, и являются тем индикатором, с помощью которого удается фиксировать проскоки посторонней микрофлоры внутрь системы. Очевидно, что для обеспечения возможности выявления единичных посторонних микроорганизмов, поступающих с различными материальными потоками в индикаторную питательную среду, необходимо определенное, установленное в предварительных экспериментах время, в течение которого концентрация посторонней микрофлоры при благоприятных условиях (значения pH, температуры и др.) достигнет уровня, легко определяемого с помощью современных микробиологических методов [134]. Как правило, для этого требуется 1,5—2 сут.

Пробы питательной среды, отбираемые из аппаратов после выдержки, исследуют затем на содержание посторонней микрофлоры. Для гарантированного сохранения асептических условий при отборе проб целесообразно использовать специальные пробоотборники [54] или оснащенные специальным монтажом стеклянные бутыли, которые обычно используют в лабораториях для выращивания микроорганизмов в жидких средах. Бутыли (или другие емкости) с небольшим количеством питательной среды предварительно, до отбора проб из аппарата, подвергают термической стерилизации в автоклаве, а затем термостатированию при заданной температуре 2 сут.

Среда в бутылях служит индикатором их стерильности.

В общем виде оценка готовности различных технических систем к работе в асептических условиях слагается из нескольких этапов: проверки герметичности; оценки стерильности; проверки эффективности стерилизации каждого из материальных потоков (воздух, питательная среда, жидкие добавки и др.), потенциальных носителей посторонней микрофлоры; экспериментальной проверки возможности поддержания асептических условий на рабочем режиме в условиях аэрации и перемешивания питательной среды.

До начала проверки оборудование должно пройти

индивидуальные испытания и отладку на воде. Рассмотрим особенности подготовки некоторых систем.

Определение готовности установок непрерывной стерилизации питательной среды. Первый этап работ по определению технической готовности УНС обычно проводят на воде. Цель его заключается в отработке режима автоматического поддержания температуры воды на выходе из нагревательной колонки при подаче в нее острого пара давлением 0,6—0,7 МПа. Одновременно настраивают регуляторы температуры теплообменника-охладителя для обеспечения на выходе его температуры воды, равной температуре культивирования.

До начала работ по отладке режимов автоматического поддержания температуры воды, подвергаемой термической стерилизации и охлаждению в УНС, должны быть сняты временные и тепловые характеристики аппаратов, входящих в состав системы приема и стерилизации питательной среды. К ним относятся: напор, развиваемый насосами, подающими питательную среду в нагревательные колонки; производительность насосов при подаче воды из приемной емкости через нагревательные колонки, в которые одновременно подается пар давлением 0,6—0,7 МПа; коэффициент разбавления жидкости конденсатом пара. Желательно оценивать время распределения $F(\tau)$ по формуле (155).

Отработку автоматического режима поддержания температуры воды на выходе нагревательных колонок и теплообменника-охладителя проводят следующим образом. В приемник питательной среды заливают воду (температуру ее фиксируют), а УНС и коммуникации прогревают острым паром. На датчике электронного моста нагревательной колонки устанавливают требуемую по регламенту температуру, например 140°С. На выходе из колонок должна автоматически поддерживаться заданная температура воды с точностью не ниже +2° С. На выходе воды после теплообменника-охладителя должна автоматически поддерживаться с точностью +2° С температура воды, устанавливаемая в соответствии с требованиями температурного режима культивирования. При этом особое внимание нужно уделять оценке и последующему обеспечению стабильности поддержания температуры, поскольку соблюдение этого требования позволит в последующем достигать

стандартности воздействия температурно-временно́го фактора на стерилизуемые жидкости.

Кроме того, во всех опытах, проводимых на воде, нужно фиксировать температуру воды на выходе теплообменника-выдерживателя. Эта информация необходима для количественной оценки интегрального теплового эффекта, получаемого жидкостью с учетом снижения температуры по длине трубчатого выдерживателя. Опыты по отладке режимов автоматического регулирования температуры воды в УНС проводят до тех пор, пока не будет обеспечено стабильное поддержание необходимой температуры с заданной точностью.

По результатам испытаний рассчитывают критерий стерилизации в соответствии с рекомендациями, приведенными в разделах 3 и 5, и с учетом $F(\tau)$. При грубой оценке минимальное время выдержки определяют, исходя из фактической производительности установки по воде и расчетной скорости движения воды в теплообменнике, которую затем умножают на поправочный коэффициент 1,25, учитывающий колебание скорости жидкости в трубопроводе и связанную с ней возможность проскока нестерильных порций питательной среды. Фактическое значение минимального времени пребывания жидкости в выдерживателе можно определить по методу меток (см. раздел 5).

Значение критерия стерилизации с учетом снижения температуры по длине трубчатого выдерживателя рассчитывают следующим образом. Продолжительность выдержки, определенную в соответствии с указанными выше рекомендациями, делят на разность между минимальной температурой на выходе колонки и минимальной температурой на выходе теплообменника-выдерживателя. Таким образом получают продолжительность выдержки воды при каждом значении температуры в указанном выше диапазоне с интервалом 1° С. Считая, что в течение этого времени температура остается постоянной, определяют значения критерия стерилизации для всех температур в диапазоне от максимальной (на выходе колонки) до минимальной (на выходе трубчатого выдерживателя) с интервалом 1° С. Полученные значения суммируют, определяя теоретическое значение критерия при данном режиме стерилизации (температуре воды на выходе колонки и выдержи-

вателя и расходе воды). Полученная величина критерия стерилизации должна быть не менее 80. При необходимости соответствующие коррективы в эту величину можно внести путем изменения расхода воды и ее температуры на выходе нагревательной колонки. Особое внимание следует уделять поддержанию необходимого давления жидкости на выходе из теплообменника-выдерживателя, которое должно гарантированно обеспечивать поддержание требуемой температуры стерилизуемой жидкости на всем пути ее выдержки.

После отработки теплового режима работы УНС на воде проверяют герметичность системы. Аппараты системы, а также арматуру и коммуникации проверяют на герметичность с помощью галоидного течеискателя в соответствии с инструкцией, прилагаемой к прибору.

Окончательная оценка готовности УНС к работе проводится на модельной питательной среде одновременно с оценкой ферментатора, поскольку наличие единичных загрязнений, как отмечалось выше, можно обнаружить лишь после 40—60 ч выдержки при 30° С в предварительно простерилизованном ферментаторе [136]. В опытах на питательной среде производительность УНС и температурные режимы принимаются по результатам опытов на воде.

Пробы на стерильность питательной среды из УНС отбирать нецелесообразно, так как в них могут быть единичные микроорганизмы-загрязнители, которые не выявляются без дополнительной выдержки всего объема загружаемой в аппарат питательной среды для увеличения концентрации микроорганизмов до величины, улавливаемой современными микробиологическими методами. В то же время лишние подключения к стерильным коммуникациям могут привести к контаминации фактически стерильной питательной среды или другой жидкости.

Определение технической готовности ферментаторов и их монтажных схем к работе в асептических условиях. Целью проводимых работ является определение возможности ведения процесса культивирования в асептических условиях. Как и в случае с УНС, предварительно проводят индивидуальные испытания и проверку на воде. Затем проверяют герметичность аппарата вместе с его монтажной схемой. Заключительные испытания

можно проводить либо сразу на рабочем режиме (подача воздуха, работа мешалки, прием среды через УНС и др.), либо по этапам с предварительной оценкой стерилизуемости ферментатора, эффективности герметизации, стерильности питательной среды, подаваемой через УНС, а также стерильности аэрирующего воздуха и различных жидких добавок.

При поэтапной проверке рабочий режим является фактически заключительным этапом испытаний, по которому и оценивают возможность ведения культивирования в данном аппарате в асептических условиях. Эффективность достижения необходимых условий на каждом из этапов можно оценить по стерильности питательной среды в ферментаторе. Однако этот метод имеет существенный недостаток — требует значительных затрат времени. С учетом подготовительных работ продолжительность одного этапа может достигать 3 сут. При проверке на модельной питательной среде стерилизуемости аппарата, стерильности воздуха, питательной среды и пеногасителя требуется не менее 15 сут на работы, предшествующие созданию рабочего режима, который имитирует процесс аэробного культивирования. На практике, как правило, эти работы длятся не менее месяца.

Поэтому целесообразно применять биологический метод проверки по питательной среде только на заключительном этапе испытания — на рабочем режиме, поскольку достижение требований, обеспечивающих поддержание в аппарате асептических условий, может быть проверено поэлементно иными методами. Например, стерилизуемость можно оценить путем анализа конструктивных узлов аппаратов и их монтажных схем, а эффективность герметизации — с помощью галоидного течеискателя. Задерживающую способность фильтров, предназначенных для стерилизации воздуха, можно оценить по бактериальному аэрозолю, например Bact. prodigiosum, или по физическим аэрозолям [60, 61]. Таким образом, схема оценки ферментаторов с применением индикаторной питательной среды может быть упрощена, но при условии самой тщательной подготовки и проведения каждого этапа испытаний. Работу по подготовке УНС, фильтров и самого ферментатора можно проводить одновременно. Момент выдачи стерильной пита-

тельной среды совмещают с приемом ее в стерильный ферментатор, в котором поддерживают давление 0,12—0,15 МПа. Поскольку стерильность питательной среды, загружаемой через УНС, не является еще доказанной, то в первом опыте проводят повторную тепловую обработку и охлаждение среды. Затем включают мешалку и подают в аппарат воздух, расход которого соответствует интенсивности аэрации, применяемой при получении целевого продукта данного микробиологического производства.

Пробы питательной среды отбирают из ферментатора через 2—2½ сут, поскольку обычно за это время единичные клетки, попавшие в аппарат, образуют популяцию, концентрация которой достаточна для определения загрязнений микробиологическими методами.

12. ОСНОВЫ СОЗДАНИЯ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ТЕХНИЧЕСКИХ УСТРОЙСТВ И ИНЖЕНЕРНЫХ СИСТЕМ ЗАЩИТЫ ПЕРСОНАЛА И ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ ОТ ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ ВРЕДНОСТЕЙ

12.1. Основные принципы

Создание различных технических устройств и систем производственной санитарии, обеспечивающих защиту внешней среды и работающего персонала, представляет собой специфическую задачу, которая должна отражать особенности микробиологических производств и решаться на основе глубокого знания существа процессов, специфичных именно для этих производств. Главная особенность заключается в том, что необходимо решать вопросы защиты применительно к биологически активным частицам (БАЧ), под которыми понимаются как сами микроорганизмы, так и продукты их жизнедеятельности, являющиеся нежелательными для окружающей среды. Другая особенность состоит в исключительном многообразии и разнохарактерности потенциальных путей поступления БАЧ из различных видов оборудования, лабораторных и производственных помещений. Важно подчеркнуть и ту особенность, что с помощью современных расчетных методов невозможно предсказать факт проскока БАЧ и момент наступления этого

события. Не могут быть обнаружены единичные БАЧ и современными экспериментальными методами. Перечисленные особенности нужно обязательно учитывать при разработке систем производственной санитарии.

Очевидно, что указанные аппараты и системы должны создаваться на основе определенных принципов, учитывающих в первую очередь особенности микробиологических производств. Мы уже отмечали, что ни в одной из опубликованных работ эти принципы еще окончательно не сформулированы, поэтому целесообразно остановиться на них более подробно, чем на деталях создания систем.

По-видимому, выбор-обоснование необходимого количества систем должен базироваться на знании всех возможных источников специфических вредностей и путей их распространения. Изучение именно этих вопросов является исходным принципом создания инженерных систем производственной санитарии. Таким образом должны быть рассмотрены сточные воды и воздух лабораторных и производственных помещений, потоки от оборудования и др. Всестороннее изучение свойств потоков — один из важных принципов создания систем. В число свойств входят мощность, дискретность или непрерывность потока, его физико-химические и биологические характеристики.

Очевидно, проще получить информацию о физико-химических характеристиках каждого потока, в том числе температуре, влажности, реакции среды, относительной плотности, вязкости и др. Затем нужно определить пути всестороннего изучения количественных и качественных характеристик биологических свойств материальных потоков (количество и концентрацию БАЧ, их фракционно-дисперсный состав, устойчивость к воздействию внешней среды), а также факторов, характерных для работы данной установки и (или) системы, возможный диапазон колебания концентрации БАЧ, мощность первичных источников, снижение концентрации по мере прохождения по трубопроводам и различным устройствам технических систем. Указанная выше информация может быть полноценной и достоверной только в том случае, если в лабораториях в большом числе опытов будут получены качественные и количественные характеристики процессов инактивации БАЧ под

влиянием тех факторов, которые характерны для работы устройств и систем в условиях промышленного производства. В решении этих вопросов следует отметить исключительную важность не только теоретических исследований и практических разработок в области кинетики инактивации, но и проведение научно-прикладных работ, направленных на создание специфических методов, обладающих повышенной по сравнению с существующими методами чувствительностью, поскольку речь должна идти об обнаружении незначительных количеств БАЧ (в некоторых случаях отдельных частиц и клеток). Полученные в лабораторных условиях количественные характеристики поведения популяций БАЧ под действием инактивирующих факторов систем профсанитарии должны быть положены в основу математических моделей, обеспечивающих эффективное масштабирование процессов инактивации.

Весьма важным является принцип выбора наиболее рационального метода удаления или инактивации БАЧ, находящихся в материальном потоке. Например, при инактивации спор микроорганизмов в сточных водах нецелесообразно в промышленных условиях ориентироваться на химический метод деконтаминации. Очевидно, в этом случае более приемлемым окажется термический метод, при котором в качестве источника используют тепло водяного насыщенного пара под давлением. Однако применительно к процессам обработки технологического и вентиляционного воздуха термический метод (электроподогрев) уже не рассматривается как оптимальный. В условиях лабораторий, имеющих дело с незначительными количествами воздуха, такой метод считается вполне приемлемым. В то же время при деконтаминации точных приборов во многих случаях оптимальным является только химический метод. Применительно к деконтаминации фильтров тонкой очистки воздуха метод обработки часто определяется свойствами фильтрующего материала и конструктивными особенностями фильтров.

При выборе метода деконтаминации следует руководствоваться не только требуемой эффективностью обработки. Это условие необходимое, но недостаточное. Должны учитываться и многие технико-экономические показатели. При химическом методе — это доступность

деконтаминанта, его стоимость, простота использования в условиях производства, безвредность для персонала, отсутствие корродирующего воздействия на оборудование и др. При тепловом методе с использованием водяного насыщенного пара под давлением следует учитывать характеристики подлежащих обработке оборудования, инструментов и др., необходимое количество пара на данном производстве, параметры пара, допустимую продолжительность обработки и др.

Выбор метода деконтаминации имеет, несомненно, большое значение. Однако для практики промышленного производства не менее важным является и обоснование способа реализации принимаемого метода. При этом должны быть учтены объемы потоков, подлежащих деконтаминации, их распределение по времени суток, зависимость технологического процесса от времени, затрачиваемого на деконтаминацию того или иного потока. Очевидно, что для предприятия должен приниматься оптимальный способ деконтаминации, обеспечивающий требуемую эффективность обработки при минимальных затратах.

В условиях микробиологического предприятия возможны два способа термической обработки стоков: циклический и непрерывный. Выбор одного из них для конкретных условий данного цеха или корпуса, а иногда и предприятия в целом должен основываться на тщательном технико-экономическом анализе с учетом свойств обрабатываемого потока. По-видимому, при малом количестве стоков, периодически поступающих в сборники, во многих случаях нецелесообразно создавать непрерывную установку термической стерилизации. Как показывает накопленный опыт, такая установка необходима и экономически оправдана при большом количестве стоков и непрерывном их генерировании в постоянно действующем лабораторном или производственном корпусе. Из существа процессов деконтаминации следует, что при выборе режимов нужно учесть и термическую устойчивость БАЧ, содержащихся в стоках, а также различные небиологические загрязнения, твердые включения, ПАВ и др. Естественно, что режимы термической обработки вегетативных клеток и спор будут существенно отличаться по своей эффективности. Однако при проектировании специалисты должны ори-

ентироваться на то, что на данном заводе, в принципе, может выпускаться широкий спектр микробиологических продуктов. Поэтому целесообразно сразу же ориентироваться на необходимость инактивации в стоках споровых форм микроорганизмов.

Исключительно важным является принцип обоснования состава технической системы, предназначенной для обработки материального потока. При этом должны быть обоснованы все технические устройства, выполняющие роль задерживающих или инактивирующих барьеров на пути потока, несущего БАЧ, от входа потока в систему и до выхода во внешнюю среду. Практическая реализация этого принципа предполагает также выбор-обоснование точек контроля и конкретных КИП, а также материала отдельных узлов и элементов, в наибольшей степени соответствующего условиям эксплуатации системы.

Следующий принцип касается обоснования количественной характеристики требуемой эффективности каждого барьера по задержке и (или) инактивации БАЧ. Кроме того, этот принцип можно успешно реализовать на практике только при условии предварительного получения в лаборатории информации о кинетике инактивации частиц под влиянием факторов технической системы (температура, время, влажность, pH среды и др.).

При решении задачи по задержке частиц всегда возникает проблема моделирования условий, характерных для промышленных технических систем, в соответствующих лабораторных установках. Появляется необходимость создания специфических расчетных методов, которые позволяли бы решать возникающие практические задачи. Чтобы успешно осуществлять масштабный переход (и для задержки, и для инактивации БАЧ), нужно сформулировать и обосновать критерии количественной характеристики эффективности тех или иных режимов. Например, сформулировать требования к эффективности функционирования технических систем в целом по обработке материальных потоков. На современном уровне развития теоретических и экспериментальных исследований количественная формулировка требований является одной из наиболее сложных и наименее разработанных проблем при решении вопросов

гарантированной защиты внешней среды от специфических вредностей микробиологических производств. Именно поэтому на практике часто пользуются методом аналогии, создавая новые системы по образу и подобию тех, которые в течение многих лет обеспечивали защиту персонала и внешней среды.

В микробиологии все бóльшее место по праву занимает принцип разделения помещений по уровню их загрязненности продуктами производства [103, 114, 144, 153]. На практике этот принцип осуществляется в виде не только планировочных решений, предусматривающих создание чистых и грязных зон (число последних определяют, как правило, в зависимости от особенностей данного производства и свойств продуктов), но и технологических решений, связанных с выбором и размещением оборудования [152].

Например, в США создан стандарт, с помощью которого помещения по чистоте классифицируются в зависимости от содержания в воздухе частиц размером 0,5 мкм или больше в 1 фут^3 (0,028 м^3) воздуха. Наиболее жесткие требования к чистоте предъявляет класс 100, допускающий максимальную концентрацию, равную 100 частицам; класс 10 000 — до 10 000 частиц и т. д. Следует отметить, что эти требования относятся к любому элементарному объему воздуха, отобранному в любой момент времени в контролируемой зоне, а не к среднему значению. Такой подход к классификации принят многими американскими и европейскими фирмами — изготовителями оборудования для чистых помещений [103].

Учитывая особенности решаемой нами задачи, сочетание строительных элементов и конструкций можно рассматривать в качестве специфической системы, также решающей задачу по защите персонала и окружающей среды.

Одним из важных и широко применяемых на практике является принцип локализации специфических вредностей. Для этого создают разнообразные боксирующие устройства, применяют их различные сочетания в зависимости от особенностей источника, генерирующего загрязнения или являющегося потенциальным их генератором [152, 153]. Для практики микробиологических производств необходимы принцип правильной реализации системы, монтаж в строгом соответствии с обоснованными и зафиксированными в проекте техническими условиями и проверка работоспособности в период комплексного опробования при проектных нагрузках.

Последнее требование очень важное, поскольку его выполнение позволяет получать достоверную информацию о действительной работоспособности систем производственной санитарии в реально ожидаемых условиях производства. В последние годы сделаны первые попытки представить в обобщенном виде требования к чистым и асептическим зонам (качество отделки внутренних поверхностей, спуск воды, доступ в помещения воздуха высококачественного состава, защитная одежда персонала) [103].

При эксплуатации обсуждаемых технических систем необходимо обеспечивать требуемую эффективность обработки в течение всего времени поступления в системы материальных потоков, несущих специфические вредности. Такая эффективность может достигаться только в том случае, если, с одной стороны, в научно-исследовательских лабораториях обоснованы надежные режимы обработки материальных потоков, а с другой, указанные системы в реальных условиях эксплуатации воспроизводят эти режимы с требуемой точностью. Например, при термической обработке стоков наиболее важно обеспечить обоснованные в экспериментах значения температурно-временно́го фактора — поддержание температуры с точностью, обеспечивающей достижение в каждом элементарном объеме жидкости требуемого интегрального теплового эффекта. Это указывает на необходимость обоснованного выбора гидродинамических и тепловых характеристик систем обработки, а также параметров КИП.

Практическое выполнение этого принципа предполагает, что уже известны количественные характеристики эффективности каждого режима, а их достоверность подтверждена экспериментально и сомнений не вызывает. Поэтому следующий принцип, который должен неукоснительно соблюдаться на практике, — это непрерывный автоматический контроль за теми параметрами и показателями, которые обеспечивают требуемую по расчету эффективность режимов. Следует отметить особую роль КИП в тех системах и технических устройствах, которые являются последними барьерами обработки потоков перед их поступлением во внешнюю среду.

Наконец, отметим принцип обеспечения надежности технических систем производственной санитарии, а так-

же их отдельных элементов и узлов. По некоторым объективным причинам требования к надежности на современном этапе развития микробиологической промышленности должны формулироваться с определенным запасом. Одна из причин — отсутствие приемлемых для промышленного производства методов обнаружения единичных БАЧ, которые неизбежно будут появляться в материальных потоках при отказе тех или иных узлов и элементов инженерных систем защиты внешней среды.

В заключении данного раздела назовем устройства и системы, служащие для обработки материальных потоков.

Технологический воздух, удаляемый из аппаратов микробиологических производств, может обрабатываться в нескольких системах, каждая из которых соответствует определенному потоку. К ним относятся системы: транспортного вакуума, предназначенные для создания разрежения в аппаратах; транспортировки и удаления сжатого воздуха, обеспечивающие аэрацию культуральной жидкости и передавливание жидкостей из аппаратов, различных воздушек, служащих для удаления и обработки воздуха, вытесняемого из заполняемых продуктами или полупродуктами аппаратов. Таким образом, понятие «технологический воздух» на практике требует создания нескольких технических систем, включающих аппараты, коммуникации, запорную и регулирующую арматуру и КИП.

Для обработки перед сбросом во внешнюю среду такого материального потока, как воздух лабораторных и производственных помещений, создают специфические системы вентиляции, обеспечивающие наряду с санитарно-гигиеническими условиями и такие условия, которые связаны с деконтаминацией поступающего в помещения и удаляемого воздуха [114].

Система канализирования стоков, собираемых из различных помещений и от аппаратов, является одной из наиболее сложных. Число подсистем, по которым транспортируются стоки, зависит от реальных характеристик этих стоков в условиях производства. При определении числа подсистем нужно учитывать не только отличия по обсемененности, но и физико-химические характеристики, а также особенности помещений и аппаратов, из которых эти стоки удаляются. Например,

стоки, собираемые из лабораторных помещений, имеют обсемененность, очень отличающуюся от таковой для стоков отделения концентрирования микробных суспензий. Стоки, удаляемые после термической стерилизации аппаратов, характеризуются повышенными температурой и давлением, а стоки после профилактической обработки помещений поступают в приемники самотеком, как правило, при комнатной температуре, но зато содержат определенные концентрации веществ-деконтаминантов.

При использовании на производствах различных сепараторов для концентрирования и осветления культуральных жидкостей фугат содержит значительное количество БАЧ, а в материальной линии поддерживается избыточное давление. Перечень примеров можно расширить, однако с позиций рассматриваемой нами задачи необходимо поставить вопрос о создании таких систем, в которые собирались бы стоки с однородными характеристиками и которые исключали бы возможность распространения загрязнений по помещениям различной степени чистоты. Совершенно необходимым представляется, например, разделение самотечных и напорных стоков. Однако при анализе стоков любого микробиологического производства можно установить, что такое разделение будет лишь первым необходимым этапом, далеко не исчерпывающим весь набор систем, предназначенных для транспортировки стоков от мест их генерации до сборных емкостей.

Практика показывает, что и при передаче различных предметов на границах между чистыми и грязными помещениями невозможно обойтись использованием передаточных устройств только одной конструкции, работающих по единому принципу. Необходимость создания набора таких устройств вытекает из разнохарактерности передаваемых предметов, их существенного различия по приемлемости и допустимости использования того или иного метода, способа и режима деконтаминации. Например, передаточные автоклавы, эффективность работы которых основана на термическом воздействии на передаваемые предметы, могут с успехом применяться для передачи различной посуды и металлической тары. Однако они непригодны для передачи на анализ устройств с пробами биологически активных веществ. Че-

рез такие автоклавы невозможно передавать КИП и точные инструменты. Поэтому исследователи и практики стремятся к созданию разнообразных передаточных устройств, обеспечивающих такие режимы эффективной деконтаминации, при которых исключено повреждение передаваемых предметов и (или) их содержимого.

В качестве своеобразного материального потока можно рассматривать персонал. Известны многочисленные попытки комплексного подхода к решению задачи обработки персонала с целью исключения загрязнения как внешней среды, так и соответствующих чистых помещений (особенно лабораторий, где готовят исходные посевные материалы) [5, 80, 93, 114]. Известны положительные примеры использования гигиенического душа, сменной одежды, направленных потоков воздуха и др.

В литературе фактически отсутствует теоретический анализ комплексной проблемы гарантированной задержки или инактивации БАЧ. В то же время очевидно, что для окружающей среды безразлично, из какого лабораторного или производственного корпуса поступили вредности, приведшие в итоге либо к нарушению сложившегося экологического равновесия, либо другим нежелательным последствиям. С этих позиций любой производственный или лабораторный комплекс микробиологических производств нужно рассматривать как некоторую сложную систему, включающую большое число материальных потоков — потенциальных носителей специфических вредностей. Такие потоки должны быть с заданной степенью гарантии обработаны, чтобы предупредить возможный выброс БАЧ в окружающую среду.

12.2. Системы вентиляции

Особенности работы. Системы вентиляции являются основными инженерными системами, целенаправленно обеспечивающими чистоту воздуха в производственных и лабораторных помещениях, а также воздуха, удаляемого из указанных помещений в окружающую среду. Загрязнения в воздух рабочих помещений поступают из самых различных источников. Например, человек, работающий за лабораторным столом, при дыхании выделяет в воздух около 100 000 частиц в минуту [103]. При энергичной работе количество частиц размером

0,3 мкм и более может увеличиться до 10^7 в минуту. Этот содержащий бактерии аэрозоль включает также частицы кожи, волос и загрязнений, попадающих в воздух с одежды, частицы пота и влаги, выделяющейся при дыхании. В некоторых случаях при нарушениях проведения лабораторных исследований в воздух помещений может попадать значительное количество микроорганизмов. Это положение можно проиллюстрировать количеством микроорганизмов в пробах после происшествий, наиболее характерных для микробиологических лабораторий [153].

Происшествие	Число колоний
В центрифуге разбита одна пробирка вместимостью 50 мл; проба воздуха взята на высоте 18 см над центрифугой	1183
Упала на пол и разбилась одна ампула с лиофилизированной культурой, проба воздуха взята на высоте роста человека	491

Известны данные о том, что вид вентиляции влияет на эффективность защиты воздуха рабочих помещений от микроорганизмов. Например, эффективным способом снижения загрязненности лабораторных помещений являются создание и поддержание в них избыточного давления за счет постоянной работы вентиляционной системы [114]. Особенно распространена вентиляция помещений предварительно профильтрованным воздухом или вентиляция рабочего места ламинарным воздушным потоком, при которой обеспечивается подача чистого нетурбулизованного воздушного потока [105]. Такой вид вентиляции обладает способностью самоочищаться, исключает перекрестные загрязнения, практически устраняет необходимость в ограничении доступа персонала, который в этом случае оказывает лишь незначительное влияние на чистоту помещения, обычно не требует использования предбоксников, воздушных шлюзов и других дополнительных устройств на входе в помещения, обеспечивает снижение эксплуатационных расходов.

В фармацевтической промышленности системы с ламинарным вертикальным и горизонтальным потоками воздуха используются для решения таких проблем, как защита продукта и (или) оператора, а также для предотвращения перекрестного загрязнения [105].

Ламинарный поток применяется успешно в лабораториях, занимающихся производством вакцин при использовании тканевых культур, а также при испытаниях на стерильность.

Одним из важнейших требований к системам вентиляции является обеспечение необходимой кратности воздухообмена. Например, лабораторные помещения должны вентилироваться свежим воздухом со скоростью обмена 10—15 смен в час [156]. Указывают на необходимость создания направленного потока воздуха от менее загрязненных к более загрязненным помещениям [102].

Выбрать необходимую эффективность систем вентиляции можно, исходя из требований к чистоте помещения или группы помещений. Пример таких требований, в основе которых лежит федеральный стандарт США 209В, заимствованный из работы [114], представлен в табл. 39.

Таблица 39. **Требования к чистоте помещений**

Класс помещений	Максимальная концентрация в 1 м³		Соотношение клетки/частицы
	всех частиц размером $\geqslant 0{,}5$ мкм	микробных клеток	
100	3 500	3,5	1/1000
10000	350 000	17,6	1/20000
100000	3 500 000	88,4	1/40000

В работе [111] приведен обзор состояния стандартных тестов в технологии так называемых чистых помещений, а также характеристика проблем, составляющих предмет стандартизации, в частности методов испытаний. Рассмотрены в основном американские стандартные методы испытаний чистоты воздуха чистых помещений.

Стандарт CS-6T «Испытание и освидетельствование чистых помещений» определяет главным образом тесты для помещений с ламинарным потоком воздуха класса 100 и содержит определенные требования в отношении ряда характерных особенностей таких помещений. Он включает тесты на проверку эффективности фильтрующей установки, на утечку воздуха, величину его потока и скорость; на подготовку и подачу воздуха; на определение резервной производительности по воздуху, на оценку ламинарности и турбулентности потока, на контроль температуры, влажности, освещенности, уровня шума и вибрации. В стандарте представлена спецификация на оборудование, операции и приборы, используемые в этих

тестах. В стандарте CS-2T «Устройства с подачей ламинарного потока чистого воздуха» содержатся спецификации по конструированию чистых стендов, лабораторных столов и других устройств с ламинарным потоком чистого воздуха. Он представляет соответствующие тесты на испытания.

Количество частиц в воздухе, рассматриваемое в качестве индикатора возможного загрязнения микроорганизмами, зависит от рабочего процесса в отдельных помещениях. Однако разница в содержании активных частиц в чистых помещениях с вентиляцией по типу ламинарного воздушного потока более существенная, чем в помещениях с обычной вентиляцией. Важно отметить, что при использовании вентиляции по типу ламинарного воздушного потока концентрация частиц в воздухе может быть на 2 порядка и более ниже, чем при использовании других типов вентиляции. С вентиляцией ламинарным потоком воздуха уже созданы не только рабочие места, но и помещения. Такой способ наиболее эффективен тогда, когда производственный процесс циклический. Чистые помещения вентилируются преимущественно вертикальным потоком [114]. (Например, при производстве различных лекарственных препаратов это оказалось весьма успешным). Поскольку физические методы функциональной проверки для чистых помещений соответствуют требованиям класса 100, авторы работы [151] экспериментально оценили возможности контаминации.

Из 10 000 ампул, наполненных 1,1 мл стерильного питательного бульона, через 3; 6 и 10 дней выбрали по одной «помутневшей» ампуле. При так называемом «контроле на стерильность» не удалось выявить загрязняющие микроорганизмы. Степень загрязнения в этом производственном помещении составила 0,03%. Эта величина лежит значительно ниже границы чувствительности метода заключительной проверки на наличие загрязняющих микроорганизмов. Задачей следующего опыта было получить ответ на вопрос о том, насколько велика потеря надежности в результате исключения системы ламинарного воздушного потока. Опыт проводили в идентичных условиях за исключением того, что вентиляцию снизили до естественного обмена между отдельными помещениями с кондиционированием воздуха. Число частиц в помещении, в котором заполняли ампулы, возросло с 500 до 45 000 на 1 м^3. Содержание микроорганизмов в воздухе, определяемое с помощью пробоотборника Андерсена, ограничивалось 50 микроорганизмами на 1 м^3. Число забракованных ампул (визуальный контроль) по сравнению с предыдущим опытом повысилось на 44% (со 179 до 258). Значительно увеличилось число ампул, загрязненных посторонней микрофлорой. Вероятность контаминации возросла в 10 раз.

Итак, обеспечение вентиляции по типу ламинарного воздушного потока, особенно при поддержании гарантированно асептических условий в лабораторных и производственных помещениях, имеет большое практическое значение.

Прямая связь между загрязнением воздуха частицами и степенью чистоты готового продукта указывает на необходимость доведения производственных условий до класса 100 для того, чтобы добиться отсутствия загрязнения микроорганизмами конечного продукта, который должен быть стерильным. Если условия класса 100 соблюдены, то можно ограничить некоторые затрудняющие работу меры, например употребление перчаток или масок для рта. При отсутствии вентиляции по типу ламинарного воздушного потока такие ограничения невозможны [114].

Требования к системам. Системы вентиляции играют важную роль в обеспечении чистоты рабочих помещений микробиологических производств и защите персонала и окружающей среды от БАЧ. Поэтому остановимся на основных требованиях к системам, исходя из особенностей микробиологической технологии.

Очевидно, что системы вентиляции должны обеспечивать необходимую кратность воздухообмена, исходя из предназначения помещений (лабораторные, производственные, чистые, грязные и др.). Воздух, подаваемый в помещение, должен иметь характеристики, отвечающие требованиям технологии (температура, влажность, наличие определенного количества посторонней микрофлоры и др.). В чистые помещения нужно подавать стерильный воздух. Не менее важно обеспечение чистоты воздуха, удаляемого из лабораторных и производственных помещений в окружающую среду. Требуемая эффективность очистки должна приниматься с учетом обсемененности воздуха, меняющейся в зависимости от чистоты помещений. С этой точки зрения объединение систем вентиляции чистых и грязных помещений недопустимо.

Условия работы микробиологических производств требуют проведения мероприятий по деконтаминации оборудования и помещений. Системы вентиляции в этом отношении не являются исключением. Простота обработки с помощью доступных и дешевых деконтаминан-

тов должна быть обеспечена для всех элементов и узлов, расположенных в загрязненных помещениях. Поскольку в любом производственном корпусе одновременно работает несколько вентиляционных систем, то взаимная их увязка по производительности и другим характеристикам (давление, разрежение, температура воздуха и др.) должна осуществляться автоматически. Отметим и необходимость блокировки работы этих систем с системами кондиционирования воздуха. Следует также принимать меры по снижению содержания микроорганизмов в воде систем кондиционирования. Отмечается, что в установках, работающих без воды, количество микроорганизмов в воздухе невелико [114]. Но если в распыляемой воде содержится 10^3—10^6 клеток в 1 мл, то в воздухе будет находиться 10^2—10^5 клеток в 1 м^3.

Для достижения и поддержания определенного уровня чистоты забор наружного воздуха нужно проводить так, чтобы ограничить, насколько возможно, попадание загрязнений, выделяемых производственными установками, лабораториями, транспортом и др. Необходимо также обеспечить правильный выбор типов фильтров, соответствующую герметизацию корпусов фильтров, правильную эксплуатацию установок, включение в систему предфильтров и размещение их в самом начале воздушной линии, исключить избыточное увлажнение фильтров.

Поскольку для предфильтров характерна низкая степень задержки БАЧ, следует постоянно учитывать возможность присутствия значительного количества БАЧ в потоке воздуха, проходящего по воздуховодам к фильтрам заключительной очистки. Негерметичность в корпусе фильтра, а также в местах горизонтальных направляющих рулонных фильтров часто служит причиной проскока микроорганизмов. Однако обслуживание рулонных фильтров требует небольших расходов. Натяжение вращающейся ленты регулируется автоматически благодаря разности давления. Хорошо оправдают себя, по-видимому, появившиеся недавно в продаже фильтры с высокоразвернутой поверхностью фильтрации и герметизацией, подобной таковой у стерильных фильтров. Большая фильтрующая поверхность будет способствовать, вероятно, увеличению срока службы этих фильтров.

Все вентиляционные системы, обеспечивающие сани-

тарно-гигиенические условия, требования к чистоте и защиту персонала и окружающей среды, должны быть надежными в работе. Наиболее надежными элементами должны являться фильтры заключительной очистки воздуха — последний барьер на пути БАЧ как в чистые помещения, так и в окружающую среду.

12.3. Герметизирующие устройства оборудования и помещений

В последние годы во многих научно-исследовательских лабораториях и на микробиологических производствах используют герметизирующие устройства, предназначенные для локализации специфических вредностей. К большинству этих устройств предъявляются типовые требования, предусматривающие необходимость обеспечения эффективной изоляции чистых помещений от грязных, возможность проверки эффективности герметизации, доступность материалов, идущих на изготовление герметизирующих устройств, возможность использования при их создании типовых элементов и узлов, невысокую стоимость, возможность гарантированной деконтаминации.

Отсутствие общепринятой классификации герметизирующих устройств, используемых в микробиологических учреждениях и на предприятиях, с одной стороны, и необходимость их рассмотрения по более или менее однотипным группам вынуждают нас предложить читателю следующий порядок изложения: боксы и боксирующие устройства, герметизирующие элементы строительных конструкций, аппаратов и коммуникаций.

Боксы. Попытки применения изолирующих устройств при выполнении лабораторных операций стали предприниматься уже в 40—50-х годах, причем они были направлены главным образом на защиту операторов от различных продуктов.

Из многих методов, применяемых для предотвращения загрязнения внешней среды, использование изолирующих устройств оказалось наиболее эффективным. К таким устройствам часто относят разнообразное оборудование: от простого вытяжного шкафа до вентилируемых костюмов и систем герметичных боксов с резиновыми перчатками.

Для микробиологической промышленности несомненный интерес представляют технические устройства, которые боксируют оборудование, генерирующее аэрозоли целевых микроорганизмов, например сепараторы. Описан герметичный бокс для центрифуги периодического действия [163].

Центрифуга размещена в специально сконструированном боксе размером 180×140×90 см, изготовленном из стали, покрытой эмалью. Центрифуга находится в нижней части бокса и отделена от верхней части перегородкой, выполняющей функцию рабочей поверхности. Такая конструкция считается более предпочтительной, чем установка бокса в верхней части центрифуги, поскольку последний вариант не обеспечивает достаточной степени защиты окружающей среды в случае поломки ротора, приводящей к утечке продукта через приводной механизм.

Точки крепления центрифуги приварены к основанию бокса с тем, чтобы в случае неисправности ротора легче было распределить энергию движения. Все соединения между боксом и связанным с ним оборудованием изготовлены из гибких шлангов. Окна с трех сторон обеспечивают хороший обзор рабочей поверхности, а большая дверь спереди — доступ в бокс. В потолке бокса вмонтированы флюоресцентная и ультрафиолетовая лампы. Для выполнения каких-либо операций вручную бокс снабжен шестью рукавами с неопреновыми перчатками. Ввод и удаление проб из полости бокса производятся через транспортное отверстие.

Ежемесячно бокс испытывают на герметичность путем заполнения его фреоном-12 и создания избыточного давления до 490—500 Па. Как и при проверке оборудования (см. раздел 11), места утечки определяют с помощью галоидного течеискателя, а затем их заделывают специальными пластиками (состав не указан). Скорость утечки менее 0,5% от общего объема бокса в час при избыточном давлении до 490 Па считают допустимой. Бокс соединен с центральной системой удаления отработанного воздуха из лаборатории, и в нем поддерживается разрежение около 372 Па во время работы центрифуги и деконтаминации. В случае утечек это обеспечивает предотвращение выхода биологически активных аэрозолей в помещение.

Во время работы центрифуги воздух нагнетается в бокс со скоростью 11,32 м³/мин. Воздух фильтруется как до поступления в бокс, так и перед выпуском путем пропускания его через высокоэффективные фильтры, защищенные предфильтрами. Высокая скорость воздушного потока гарантирует быстрое осаждение аэрозолей на фильтре и обеспечивает дополнительно охлаждение центрифуги. Перепад давления на фильтрах контролируется манометрами, и в случае, если показания в 2 раза превысят первоначальное значение, фильтр автоклавируют и заменяют.

По окончании работы центрифуги и после удаления проб через транспортное отверстие бокс стерилизуют химическим методом. Для этого в нижнюю часть бокса через теплообменник для обеспечения полного испарения подается смесь, состоящая из 12% окиси этилена и 88% фреона-12. Необходимая концентрация стерилизующей смеси в боксе поддерживается автоматически.

Во внутренние стенки бокса вмонтированы электрические масляные радиаторы. В начале цикла деконтаминации к ним подается энергия, в результате температура в боксе повышается до 55° С и регулируется двумя последовательно установленными термостатами. Увлажнитель, расположенный в верхней части бокса, генерирует достаточное количество пара для поддержания относительной влажности на уровне 50+5%. Когда бокс заполнен смесью окиси этилена с фреоном, автоматически включаются четыре вентилятора, установленные горизонтально на рабочей поверхности. Вентиляторы обеспечивают равные условия по температуре, влажности и концентрации газа в боксе.

После экспонирования в смеси окиси этилена и фреона в течение 16 ч при 55° С и 50% относительной влажности бокс вентилируют воздухом, который вытесняет смесь через дно бокса. При этом деконтаминирующий газ проходит через струю воды, которая поглощает окись этилена, фреон выпускается в атмосферу через систему удаления отработанного воздуха из лаборатории. Для опорожнения бокса требуется 30 мин. Затем через бокс пропускается воздух еще в течение 15 мин для удаления остаточных следов окиси этилена. Обычно бокс очищают в течение ночи. Во время стерилизации в различных местах бокса распределяются биологические индикаторы.

Особенности устройства и эксплуатации бокса рассмотрены достаточно подробно для того, чтобы показать сложности решения задач по локализации БАЧ в условиях микробиологических производств. Бокс является, по существу, одной из элементарных ячеек, в которых осуществляется комплекс процессов, обеспечивающих защиту персонала и окружающей среды от БАЧ (герметизация и оценка ее эффективности, очистка воздуха методом фильтрации, химические методы деконтаминации, эффективная вентиляция, в том числе и с применением ламинарного потока воздуха).

В последние годы появилось много различных конструкций боксов. Поэтому предпринимаются попытки их классификации по разным признакам. Например, боксы разделяют на три класса. К классу I относится бокс с открытой передней частью, скорость прохождения воздуха через отверстие около 23—30 м/мин. Бокс класса II аналогичен боксу класса I, но рабочее отверстие закрыто перегородкой с отверстиями, которые могут быть или открытыми, или с вмонтированными резиновыми перчатками. Боксы класса III герметичные, с так называемой абсолютной изоляцией. Подаваемый в них воздух проходит через высокоэффективные воздушные фильтры. Боксы всех типов соединены через такие фильтры или устройства для термической стерилизации с вытяж-

ными вентиляторами. Таким образом в атмосферу выбрасывается гарантированно обработанный воздух.

Как отмечалось выше, удалить загрязнения из локальной и общей зон контаминации можно наиболее быстро и эффективно с помощью методов, основанных на использовании ламинарного потока воздуха. В горизонтальном или вертикальном воздушном потоке, перемещающемся без сильного возмущения, поперечный поток аэрозоля либо незначителен, либо отсутствует вовсе, поскольку частицы быстро увлекаются с рабочей поверхности в систему высокоэффективных фильтров, составляющих часть системы рециркуляции воздуха. Бокс с ламинарным потоком воздуха стал одним из элементов изолирующего оборудования, способного обеспечивать предотвращение контаминации продукта и защиту оператора. На рис. 44 показано движение воздуха в

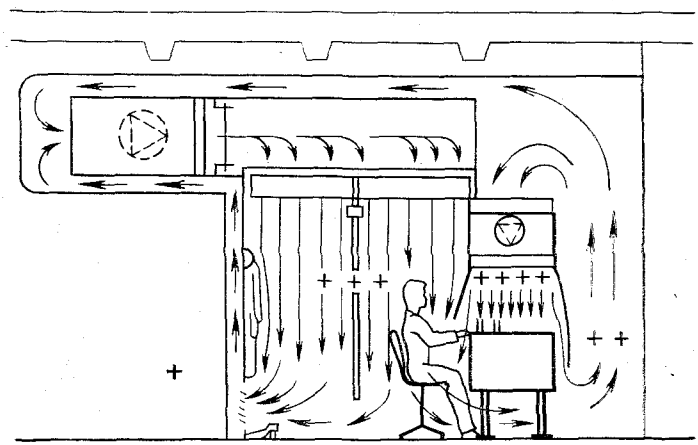


Рис. 44. Принципиальная схема воздушного потока в микробиологическом боксе.

Скачкообразное снижение давления обозначено знаком +.

типичном микробиологическом боксе с ламинарным потоком. Боксы такого типа имеют некоторые особенности [158]. Например, горизонтальный поток воздуха является, на первый взгляд, экономически более выгодным,

чем вертикальный, поскольку требует небольшой фильтрующей поверхности. Однако вертикальный поток обеспечивает более эффективное удаление всех частиц из бокса. Если при требуемой скорости потока 0,45 м/с гарантируется расход воздуха около 1600 м³/ч на 1 м² фильтрующей поверхности, то этот режим является оптимальным.

При разработке конструкции бокса особое внимание было уделено тому, чтобы стенки бокса не имели выступов и все клапаны и регуляторы давления в подводящей магистрали монтировались вне помещения. Там, где это возможно, использовали стенки с двойным остеклением до самого пола с тем, чтобы у работающего персонала не появлялось чувства изолированности. Освещается бокс снаружи. Желательно бесшовное покрытие пола (поливинилхлорид, эпоксидные смолы и др.), однако в боксе сделаны стойкие к истиранию керамические полы, поскольку осколки разбитой посуды на таком полу не оставляют царапин.

Для обеспечения максимальных требований производственной санитарии воздух, выбрасываемый из микробиологических боксов с ламинарным потоком, должен отводиться по трубам из лаборатории в системы окончательной очистки.

Современные микробиологические боксы с ламинарным потоком воздуха имеют и определенные недостатки, которые следует учитывать на практике. Рециркуляция около 75% воздуха, подаваемого в бокс, препятствует использованию бокса для изоляции воспламеняющихся растворителей. В устройствах, в которых выпускаемый из бокса воздух попадает вновь в окружающую среду помещения, нельзя надежно изолировать вещества с неприятным запахом. Подобные недостатки сводят применение такого бокса лишь для изоляции контаминантов в виде частиц. Существенным недостатком является и трудность контроля рабочего режима. Опыт показал, что большинство проверяемых в рабочих условиях боксов не отвечает требованиям воздушного баланса и эффективности фильтрации.

Из данных табл. 40 следует, что в результате испытаний 94 боксов различных типов, изготовленных различными фирмами, 52% оказались дефектными из-за пропуска фильтров, 64% забракованы из-за неприемле-

Таблица 40. **Результаты испытаний в рабочих условиях микробиологических боксов с ламинарным потоком [105]**

Тип и число испытанных боксов	Число боксов с пропуском фильтров	Число боксов с неприемлемым профилем скоростей	Расчетная скорость направляемого в бокс потока воздуха, м/мин
A, 29	18	11	6,0—12,0
B, 22	10	18	2,1—12,0
C, 12	8	11	5,1
10	7	7	6,0—12,0
E, 5	1	0	11,2
F, 8	0	8	—
6	3	6	—
H, 2	2	0	9,1
Всего 94	49	61	—

мого профиля скоростей воздуха. Таким образом, существующие конструкции боксов далеко не совершенны и не в полной мере отвечают требованиям микробиологических производств.

Герметизирующие элементы строительных конструкций. Интересный и заслуживающий внимания специалистов материал приведен в работах [103, 114, 153], в которых обсуждены проблемы внутреннего устройства помещений в плане обеспечения требований производственной санитарии. Полагают, что в современных конструкциях производственных сооружений микробиологического профиля нельзя обойтись без доступных для внутреннего осмотра межэтажных перекрытий, необходимых для прокладки воздуховодов, электрокабелей и др. Рекомендуют также систему подвесных потолков, которые должны быть влаго- и газонепроницаемыми, устойчивыми к вибрации и ультрафиолетовым лучам, допускать возможность легкой очистки и обработки. Повышенные требования, предъявляемые к чистым помещениям, вынуждают применять в основном сталь и алюминий. Для стен перегородок часто используют облицованные панели, соединяемые алюминиевыми пластинами с мастичным уплотнением. Иногда применяют стальные перегородки. Полы покрывают листами окрашенного поливинилхлорида, которые сваривают встык. Плинтусы выполняют также из поливинилхлорида.

Часто большие трудности возникают при решении

проблемы герметизации стыковых швов. Они должны дополнительно герметизироваться в местах стыковки плит, вводов трубопроводов, воздуховодов, силовых кабелей и др. На рис. 45 приведен пример герметизированной заделки трубопроводов в строительную перегородку (расположена на границе чистого и загрязненного помещений); применен металлический лист, через который проходят трубопроводы, в том числе и подлежащие обработке острым паром. Герметизация обеспечивается приваркой сильфонов к трубопроводам и стальному листу. Возможны и другие решения, например использование сальников с двойным уплотнением. При этом выбор наиболее приемлемого варианта зависит от конкретных условий производства и лаборатории, а также требуемой эффективности герметизации на границе чистого и загрязненного помещения.

На практике межэтажные перекрытия часто разделяют помещения различной степени чистоты. В этом случае возникает задача герметизации всех трубопроводов, кабелей и других коммуникаций, проходящих через перекрытие. Один из вариантов решения этой задачи показан на рис. 46. В перекрытии закреплена гильза (кусок трубопровода), через которую проходит техноло-

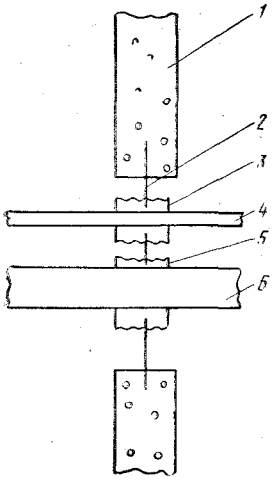
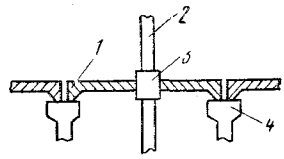


Рис. 45. Принципиальная схема герметизации трубопроводов, проходящих через строительную перегородку на границе чистого и загрязненного помещений:

1 — строительная перегородка; 2 — металлический лист; 3, 5 — сильфоны; 4, 6 — трубопроводы

Рис. 46. Принципиальная схема герметизации трубопровода, проходящего через межэтажное перекрытие:

1 — плита перекрытия; 2 — трубопровод; 3 — гильза; 4 — опорная балка.



гический или другой трубопровод из чистого в загрязненное помещение. Зазоры между гильзой и трубопроводом, гильзой и перекрытием уплотняют с помощью различных герметиков.

Важными элементами строительных конструкций являются окна, герметизация которых должна исключать возможность проникновения БАЧ во внешнюю среду. Имеющиеся технические решения не в полной мере отвечают современным требованиям, поэтому помещения, где требуется особая чистота, часто строят без окон, обеспечивая искусственное освещение и необходимую эффективность вентиляции. По-видимому, такой подход можно использовать и при решении задачи гарантированной защиты внешней среды от БАЧ.

В последние годы немаловажная роль в обеспечении герметизации строительных конструкций отводится различным герметикам, которые могут использоваться не только при облицовке стен и покрытии полов, но и при заделке различных неплотностей, появляющихся при строительстве и эксплуатации лабораторий и производств.

Герметизирующие элементы аппаратов и коммуникаций. Оборудование и коммуникации микробиологических производств непосредственно контактируют с продуктами и полупродуктами, обладающими высокой биологической активностью. Эта особенность во многом определила тот большой интерес, который проявляют биологи, технологи и конструкторы к созданию самых разнообразных герметизирующих элементов (наиболее важные из них названы в разделе 7). На практике в системах профсанитарии встречаются самые различные варианты уплотнений валов аппаратов: двойное сальниковое и лабиринтное, многочисленные разновидности торцевых и обычных сальниковых уплотнений. Ни одна выполненная в натуре аппаратурно-технологическая схема современного микробиологического предприятия не может обойтись без значительного числа фланцевых соединений, гильз для КИП, различных бобышек. Их проектирование, тщательное изготовление и монтаж — необходимое условие обеспечения требуемой эффективности герметизации. Наконец, самым распространенным герметизирующим устройством является запорная и регулирующая арматура.

Одной из главных особенностей технических устройств профсанитарии на микробиологических производствах, непосредственно влияющей на эффективность локализации БАЧ, является одновременная работа групп взаимосвязанных аппаратов (а также трубопроводов, КИП и арматуры) как единых технических систем, в которых каждый узел и элемент служит потенциальным источником поступления БАЧ в окружающую среду. Поэтому для создания систем с требуемой эффективностью герметизации необходимы количественная оценка этой характеристики для всех технических устройств, выявление слабых элементов и узлов и разработка обоснованных решений по их замене или резервированию. Методический подход к решению этой задачи уже обсуждался в литературе [48, 49].

Следует отметить, что планомерное накопление статистических данных дегерметизации элементов, узлов и аппаратов, работающих в составе технических систем, является необходимым этапом в решении задачи эффективной защиты внешней среды от специфических вредностей микробиологических производств.

12.4. Устройства для обработки мелкого оборудования, приборов и инструмента

В работе микробиологических лабораторий и производств постоянно возникает необходимость передавать различные предметы из помещений одного класса чистоты в помещения другого класса. Для этого создают различные передаточные устройства, которые должны обеспечить высокую эффективность обработки передаваемых предметов, сохранение их свойств (например, при передаче пробников с материалами), характеристик (при передаче сложных приборов), надежную изоляцию чистых помещений от загрязненных, простоту обслуживания, возможность автоматического управления режимами обработки. Эти устройства должны быть надежными в работе и по возможности изготовляться из дешевых и легкодоступных материалов.

К настоящему времени разработано много различных конструкций передаточных устройств, однако принципы их работы можно показать на примере трех типов

наиболее распространенных устройств: проходного автоклава, передаточной камеры с парогазовой обработкой и жидкостной ванны пронырывания.

Так, работа передаточного автоклава, устанавливаемого на границе чистых и загрязненных помещений (рис. 47), основана на деконтаминации передаваемых

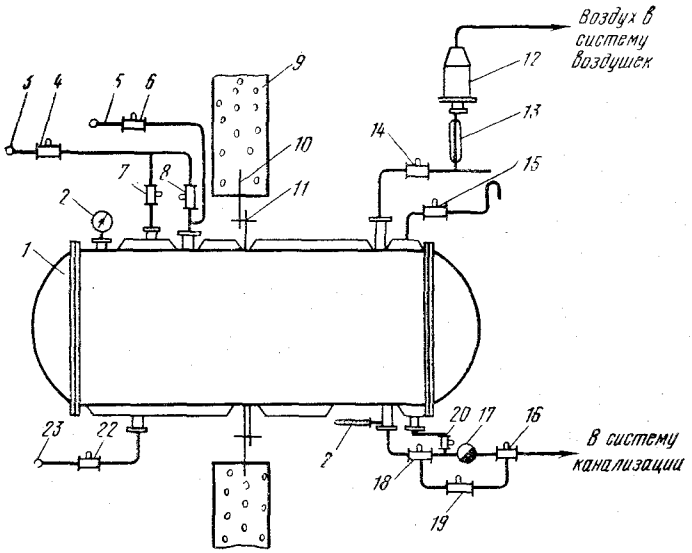


Рис. 47. Принципиальная монтажная схема автоклава, устанавливаемого на границе чистых и загрязненных помещений:

1 — автоклав; *2* — мановакуумметр; *3* — коллекторный трубопровод пара; *4* — отключающий вентиль на линии пара; *5* — коллекторный трубопровод моющего раствора; *6* — вентиль на линии моющего раствора; *7* — вентиль на линии пара в рубашку автоклава; *8* — вентиль на линии пара в корпус автоклава; *9* — строительная перегородка; *10* — стальной лист; *11* — «воротник» автоклава; *12* — фильтр на линии воздушки из корпуса автоклава; *13* — подогреватель; *14* — вентиль на линии воздушки; *15* — вентиль на линии воздушки из рубашки автоклава; *16, 18, 19* — вентили на линии отвода конденсата из автоклава; *17* — конденсатоотводчик; *20* — вентиль на линии конденсата из рубашки автоклава; *21* — термометр; *22* — вентиль на линии воды; *23* — коллекторный трубопровод воды.

предметов с помощью водяного насыщенного пара повышенного давления. Обычно температуру пара во внутренней полости поддерживают в диапазоне 125—140° С. Пар вводят в верхнюю точку, а паровоздушную смесь отводят из нижней точки, поскольку воздух имеет плотность бóльшую, чем пар, и накапливается именно в нижней части автоклава, существенно снижая в ней

температуру. Именно поэтому только в нижней точке целесообразно измерять температуру автоклавирования. Для обеспечения равномерного распределения температур и уменьшения теплопотерь автоклав снабжен рубашкой, в которую подается пар тех же параметров, что и во внутреннюю полость.

Для сокращения общей продолжительности рабочего цикла предусмотрено принудительное охлаждение автоклава подачей в рубашку охлаждающей воды. Воздух из автоклава при необходимости вытесняется через воздушку, на линии которой смонтирован фильтр тонкой очистки воздуха, исключающий возможность контаминирования обрабатываемых предметов посторонней микрофлорой, а также предупреждающий возможный вынос БАЧ с воздухом, вытесняемым из автоклава. Очевидно, что конструкция фильтра должна гарантировать его работоспособность и в случае увлажнения фильтрующего материала. Герметизация автоклава в строительной перегородке обеспечивается приваркой к нему стального листа (по периметру к корпусу автоклава), герметично подсоединенного к другому стальному листу, предварительно смонтированному в перегородке.

Контроль за процессом деконтаминации осуществляют по показателям термометра, учитывая интегральный тепловой эффект стадий нагревания, выдержки и охлаждения (см. разделы 3 и 5).

Главное достоинство автоклавов — это возможность эффективной обработки предметов, загрязненных большим количеством БАЧ, в том числе и споровыми формами микроорганизмов. Однако недостаток их заключается в невозможности передачи (с обработкой) проб с термолабильными материалами, точных инструментов и предметов, не выдерживающих термической обработки. Некоторые такие предметы можно передать через передаточные камеры (рис. 48). Режимы, гарантирующие полноту обработки, должны предварительно обосновываться в лабораториях при изучении кинетики инактивации в зависимости от температуры, времени, вида и концентрации БАЧ, а также вида и концентрации деконтаминантов.

На практике встречаются случаи, когда передаваемые предметы можно обработать только в растворе деконтаминанта. Для решения этой задачи служат ван-

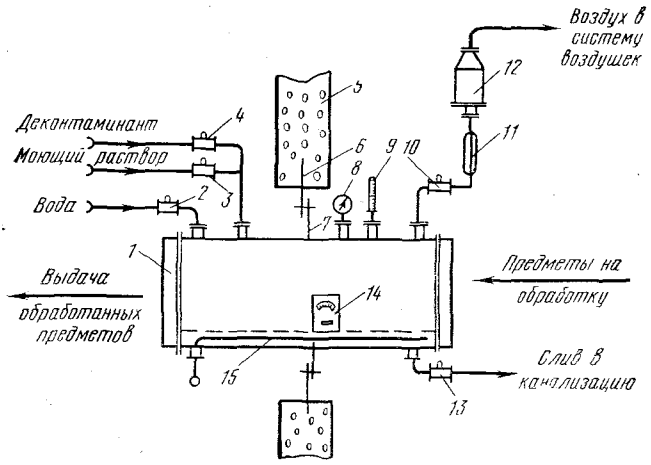


Рис. 48. Принципиальная монтажная схема передаточной камеры для обработки в газовой и парогазовой среде:

1 — камера; *2* — вентиль на линии воды; *3, 4* — вентили на линиях моющего раствора и деконтаминанта соответственно; *5* — строительная перегородка; *6* — металлический лист; *7* — «воротник» камеры; *8* — мановакуумметр; *9* — термометр; *10* — вентиль на линии воздушки; *11* — подогреватель; *12* — фильтр; *13* — вентиль на линии слива в канализацию; *14* — обрабатываемый предмет; *15* — подогреватель.

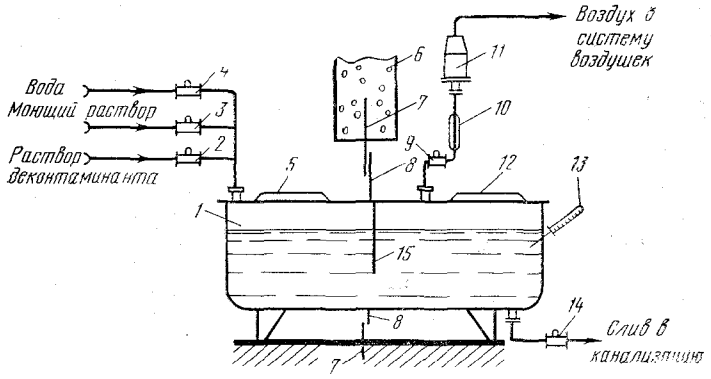


Рис. 49. Принципиальная монтажная схема передаточной ванны:

1 — ванна; *2—4* — вентили на линиях деконтаминанта, моющего раствора и воды соответственно; *5* — крышка для загрузки предметов; *6* — строительная перегородка; *7* — стальной лист; *8* — «воротник» ванны; *9* — вентиль на линии воздушки; *10* — подогреватель; *11* — фильтр; *12* — крышка для выгрузки предметов; *13* — термометр; *14* — вентиль на линии слива в канализацию; *15* — перегородка внутри камеры.

ны проныривания (рис. 49). Корпус ванны выполнен из стали или сплава, устойчивого к воздействию деконтаминантов. Для исключения перетекания загрязненного воздуха раствор деконтаминанта заливают так, чтобы его уровень был выше нижнего края перегородки ванны.

В проект некоторых исследовательских корпусов включают также камеры с ультрафиолетовым излучением и различные шлюзы [103, 114, 153], однако количественные характеристики эффективности их работы, как правило, не публикуются.

12.5. Проблемы деконтаминации персонала лабораторий и микробиологических производств

Во многих публикациях высказывается мнение о необходимости деконтаминации персонала, однако не приводятся количественные характеристики санитарных пропускников и подробное описание их работы [103, 114, 153]. В то же время совершенно очевидно, что работники, входящие в помещения или выходящие из них, представляют собой своеобразный дискретный материальный поток. В первом случае с этим потоком в чистые помещения могут вноситься различные деконтаминанты, а во втором — выноситься БАЧ, с которыми экспериментируют в лаборатории или получают на микробиологическом производстве. Поэтому исключительно важно изучить все особенности работы санитарных пропускников и обеспечить требуемую эффективность обработки персонала. Последняя достигается с помощью комплекса различных мероприятий: смена одежды и ее деконтаминация, гигиенический душ и направленные потоки воздуха, применение шлюзов и др.

Предпринята попытка количественно определить эффективность одного из процессов, осуществляемых в санитарных пропускниках [79]. Войлочные коврики, пропитанные раствором деконтаминанта, рассматривали в качестве барьеров, препятствующих разносу на обуви контаминантов за пределы рабочей зоны. Деконтаминацию одежды и тела, а также перенос контаминантов с воздухом не рассматривали. Предложенная методика нацеливает фактически на необходимость накопления статистических данных и их анализа применительно к

различным барьерам на пути контаминантов во внешнюю среду, однако она не позволяет прогнозировать ожидаемую или необходимую эффективность и не учитывает всего комплекса процессов, фактически реализуемых в санитарных пропускниках.

Проведение всесторонних теоретических и прикладных исследований с целью создания методов количественной оценки эффективности деконтаминации персонала, а также соответствующих технических устройств является одной из важнейших задач, требующей совместных усилий микробиологов, технологов и конструкторов.

13. МЕТОДИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ОЦЕНКЕ ТРЕБУЕМОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ РАБОТЫ СИСТЕМ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ ПОЛУЧЕНИЕ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ И ЗАЩИТУ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ

В принципе для успешного функционирования подавляющего большинства микробиологических предприятий должны решаться (наряду с другими) две тесно взаимосвязанные задачи: защита технологического процесса от посторонней микрофлоры (внутренняя задача) и защита окружающей среды от получаемых на предприятиях микроорганизмов и (или) продуктов их жизнедеятельности (внешняя задача). Единство этих задач заключается в том, что с помощью тех или иных режимов, методов и технических устройств необходимо воспрепятствовать проникновению микрофлоры и других БАЧ за пределы аппаратов, коммуникаций и помещений. Очевидно, что в обоих случаях требуется обеспечить определенную эффективность задержки и (или) инактивации БАЧ.

13.1. Внутренняя задача

Постановка вопроса. Процессы, обеспечивающие достижение и поддержание асептических условий, отличаются как по своему внутреннему содержанию, так и по механизму, который в итоге исключает доступ контаминантов во внутренние полости аппаратов и коммуникаций. Важно отметить, что рассматриваемые процессы независимы в том смысле, что высокая эффективность реа-

лизации одного из них совершенно не означает такую же эффективность реализации другого. Более того, недостаточно эффективное осуществление любого из процессов неизбежно ведет к контаминации оборудования и получаемых продуктов. В связи с этим аппараты и связанные с ними стерильные коммуникации и узлы (устройства для дозирования стерильных растворов, фильтры для очистки воздуха, запорная и регулирующая арматура и др.) необходимо рассматривать как некоторые самостоятельные технические системы. Их характеристики и реализуемые режимы должны обеспечивать достижение асептических условий и сохранение их в течение требуемого промежутка времени, диктуемого, как правило, особенностями технологии (например, в течение цикла культивирования и передачи культуральной жидкости на последующую обработку).

Низкая чувствительность и ретроспективность существующих методов контроля асептики, вероятностный характер процессов контаминации и очевидная необходимость получения чистых культур микроорганизмов указывают на целесообразность обеспечения требуемой эффективности процессов на всех этапах создания соответствующих технических систем, т. е. при обосновании требований к ним, определении состава, теоретических расчетах, экспериментальной проверке отдельных элементов, узлов и аппаратов; при проектировании, монтаже и комплексном опробовании этих систем.

Для обоснованного и эффективного создания таких систем необходимо знать качественные и количественные характеристики всех без исключения потенциальных источников посторонней микрофлоры, а также процессов, реализация которых в практике функционирования лабораторных, экспериментальных и производственных установок может послужить причиной проникновения посторонней микрофлоры во внутренние полости оборудования и коммуникаций. Это означает, что в результате тщательного анализа должны быть выявлены все возможные пути поступления посторонней микрофлоры в аппараты и коммуникации на всех стадиях получения, обработки и фасовки препаратов — целевых продуктов микробиологических производств. Далее, нужно дать по возможности полную микробиологическую характеристику источников и путей поступления

контаминантов. При этом необходимо знать видовой состав и концентрацию микроорганизмов, а также диапазон варьирования этих показателей по времени года, снижение концентрации по мере прохождения технических систем предварительной очистки материальных потоков (например, станций химической очистки воды, фильтров предварительной очистки воздуха на входе его в воздушную компрессорную).

Разработчики технических систем и аппаратов в своих расчетах должны принимать максимально возможные в данных условиях завода входные концентрации микроорганизмов, чтобы гарантировать в последующем действительно эффективное удаление посторонней микрофлоры из материальных потоков. При создании систем термической обработки этих потоков следует ориентироваться не только на максимальные концентрации контаминантов, но и на максимальную термическую устойчивость посторонней микрофлоры, подлежащей инактивации.

При решении задач по гарантированной обработке материальных потоков с целью достижения и поддержания асептических условий необходимы методы количественной оценки эффективности работы каждого аппарата и каждой системы. В то же время анализ материалов, изложенных в предыдущих разделах, позволяет заключить, что только для процессов термической стерилизации определенных конструкций элементов, узлов и аппаратов, а также некоторых жидкостей (растворы сахаров) разработаны методы, приемлемые для количественной оценки эффективности конкретных режимов [47, 108].

Эти методы в силу своей ограниченности не могут быть использованы для количественной характеристики процессов герметизации (или дегерметизации) оборудования и коммуникаций, а также стерилизации технологического воздуха. Кроме того, еще не созданы методы сравнительной оценки эффективности реализации всего комплекса процессов, связанных с достижением и поддержанием асептических условий. Именно отсутствие таких методов практически исключает возможность прогнозирования и выявления «слабых» элементов и режимов, а значит, и не позволяет принимать обоснованные решения как по резервированию или замене элементов,

так и по постановке исследований, связанных с повышением эффективности технических систем и реализуемых в них режимов. Следовательно, без обоснования и внедрения в практику соответствующих расчетных методов невозможно грамотно и целенаправленно создавать технические устройства, обеспечивающие гарантированное получение чистых культур микроорганизмов.

Из проведенного анализа следует, что в сложившихся условиях дальнейшее развитие и практическое решение научно-прикладной проблемы гарантированного получения чистых культур микроорганизмов (а значит, и чистых микробиологических препаратов) невозможно без разработки методов количественной (в том числе и сравнительной) оценки всех процессов, непосредственно связанных с инактивацией или задержкой посторонней микрофлоры. Очевидно в то же время, что разработка этих методов должна базироваться на глубоком знании существа основных процессов получения микробиологических препаратов. Она должна учитывать и современный уровень развития методов контроля стерильности оборудования, коммуникаций и различных материальных потоков (пеногасители, воздух, питательные среды, растворы сахаров и др.).

Для проблемы гарантированного получения чистых культур микроорганизмов характерны некоторые особенности, вытекающие из сущности микробиологических производств и поведения популяций микроорганизмов. Одна из основных особенностей заключается в многообразии не только путей, по которым контаминанты могут поступать в чистые культуры, стерильные аппараты и коммуникации, но и в разнообразии видового состава посторонней микрофлоры, качественных и количественных характеристик популяций микроорганизмов в различных материальных потоках, подлежащих обработке.

Как правило, независимо от источника и пути поступления контаминантов наблюдается один результат — развитие посторонней микрофлоры и загрязнение получаемых продуктов. Природа явления контаминации такова, что проскоки посторонней микрофлоры в аппараты и коммуникации по каждому из возможных путей являются независимыми событиями. Важно отметить, что в настоящее время сам факт проникновения посторонних микроорганизмов в процесс, а тем более момент

наступления этого события, не может быть зафиксирован ни одним из существующих методов. Как отмечалось выше, еще не созданы экспериментальные и расчетные методы, которые позволяли бы предсказывать ожидаемое время поступления контаминантов в аппараты по тому или иному материальному потоку для каждого конкретного производства.

В разделе 1 было показано, что контаминанты имеют неоспоримые преимущества перед подавляющим большинством целевых микроорганизмов как по времени генерации, так и способности конкурировать за питательные вещества. Это замечание целиком относится и к микроорганизмам рода Bacillus, представляющим наибольшую опасность при осуществлении процессов термической стерилизации оборудования и жидкостей.

Как показывают результаты анализа состояния современных методов контроля за чистотой получаемых культур и стерильностью оборудования, жидкостей или воздуха, одна из главных их особенностей состоит в длительности получения ответа, который, как правило, получают уже после завершения контролируемой операции. Так, в разделе 11 отмечено, что при имитации процесса культивирования на питательной среде ответ о ее чистоте получают не ранее чем через 2 сут после отбора пробы [136]. Исключительно низкой является чувствительность практически всех применяемых для контроля методов, что не позволяет обнаруживать единичные микроорганизмы, хотя последние при определенных условиях представляют большую опасность для многих процессов современных микробиологических производств.

В разделе 10 уже говорилось о сомнительности заключений о чистоте продуктов даже в тех случаях, когда в исследуемых пробах не была обнаружена посторонняя микрофлора. Многочисленные данные свидетельствуют о том, что на объективность заключения и количественную оценку содержания посторонних микроорганизмов влияет значительное число факторов: объем исследуемой пробы [42, 155, 156], интенсивность и способ ее перемешивания [143], количество определяемых с помощью микроскопа полей и микроорганизмов [134]. На результаты заключения могут повлиять условия отбора и исследования проб, касающиеся соблюдения требований

асептики (проба может быть загрязнена при осуществлении этих операций). Таким образом, современные методы контроля не в полной мере отвечают требованиям микробиологических производств, не обеспечивают получения достаточно объективной и своевременной информации о соблюдении или нарушении требований асептики.

Постоянно возрастающие требования к стандартности и качеству препаратов микробиологических производств диктуют необходимость создания таких аппаратов и систем, которые бы обеспечивали гарантированную защиту продуктов от посторонней микрофлоры. Очевидно, что для прогнозирования и целенаправленного управления процессом получения чистых культур необходима количественная характеристика этой гарантии.

Исключительная сложность, многообразие и разнохарактерность процессов, осуществляемых при достижении и поддержании асептических условий в ферментаторах и других аппаратах, а также в коммуникациях, невозможность прогнозирования момента контаминации, взаимная независимость путей поступления посторонней микрофлоры приводят к заключению о том, что явление контаминации носит вероятностный характер. Такой подход к решению проблемы получения чистых культур микроорганизмов позволяет утверждать, если вероятность контаминации при проведении какого-либо из указанных процессов составляет 0,005, то это означает, что в 995 случаях из 1000 следует ожидать чистых операций. Для практики микробиологических производств вероятностный подход к решению задачи получения чистых культур дает возможность количественно охарактеризовать как отдельные процессы, так и их совокупность. Ясно, что вероятность получения чистых культур микроорганизмов всегда меньше, чем вероятность чистых операций при проведении одного из процессов.

В зависимости от уровня решаемой задачи вероятность достижения необходимых условий может рассматриваться применительно к элементарной операции (стерилизация одной пробирки в автоклаве), совокупности элементарных операций (автоклавирование большого числа пробирок одновременно), к процессам, реализуе-

мым в аппаратах периодического действия (стерилизация питательной среды в ферментаторе) или непрерывного действия (установка стерилизации жидкости, отдельный фильтр для стерилизации воздуха) и др. Наконец, в наиболее сложном случае должна рассматриваться определенная техническая система (например, система транспортировки и получения стерильного воздуха) с позиций обеспечения требуемой вероятности достижения асептических условий в проходящем через систему материальном потоке.

Если проанализировать все процессы и операции на современном микробиологическом предприятии, служащие для получения чистых культур, нетрудно заметить, что одновременно в различных лабораториях и цехах осуществляются все перечисленные выше процессы и операции как на элементарном, так и на системном уровне. При этом наиболее сложными являются достижение и поддержание гарантированных асептических условий в технических системах, характерных для промышленного производства, и в первую очередь в ферментаторах. Применительно к комплексу протекающих в ферментаторе процессов, а также учитывая их независимость, вероятность получения чистых культур микроорганизмов можно рассматривать как произведение:

$$P_{\text{м}} = P_1 P_2 P_3 P_4 P_5 P_6, \tag{213}$$

где $P_{\text{м}}$ — вероятность получения чистых культур микроорганизмов; P_1—P_6 — вероятность получения чистых операций: P_1 — при герметизации оборудования и коммуникаций, P_2 — при стерилизации оборудования и коммуникаций, P_3 — при стерилизации воздуха, P_4 — при стерилизации питательной среды, P_5 — при стерилизации пеногасителя, P_6 — при стерилизации жидких добавок (например, растворов предшественников, водных растворов сахаров и др.).

В более общем виде

$$P_{\text{м}} = \prod_{i=1}^{n} P_i, \tag{214}$$

где n — число процессов (операций), при которых возможно загрязнение ферментаторов посторонней микрофлорой; P_i — вероятность загрязнения i-операций посторонней микрофлорой не только при осуществлении процессов герметизации и стерилизации, но и при отборе проб, введении посевного материала и др.

Исходя из особенностей проблемы получения чистых культур и учитывая независимость обсуждаемых выше

процессов и невозможность прогнозирования момента проникновения контаминантов по каждому из реально существующих путей, при создании соответствующих технических систем, аппаратов и узлов необходимо осуществлять на практике принцип равной эффективности обработки всех материальных потоков — потенциальных носителей посторонней микрофлоры. В соответствии с этим принципом вероятность получения чистых культур микроорганизмов нужно рассматривать как произведение равных вероятностей, или:

$$P_{\text{м}} = P_i^n, \qquad (215)$$

где $P_i = \text{const}$.

Таким образом, если при достижении и поддержании асептических условий в ферментаторах необходимы три процесса, а вероятность получения чистых операций в каждом из них равна 0,95, то вероятность получения чистых культур микроорганизмов составит $0{,}95^3 = 0{,}86$; при четырех процессах $P_{\text{м}} = 0{,}95^4 = 0{,}81$, при пяти $P_{\text{м}} = 0{,}77$. Итак, чем больше процессов и операций непосредственно связано с обеспечением чистоты получаемых культур микроорганизмов, тем выше должна быть эффективность обработки каждого из материальных потоков — носителей микрофлоры, направляемых в ферментатор.

У специалистов, работающих в области микробиологической технологии, часто возникает практический вопрос: какой же степени стерильности следует добиваться при стерилизации оборудования, жидкостей. Возникают такие вопросы и относительно требуемой эффективности герметизации аппаратов и коммуникаций, стерилизации воздуха. В то же время опубликованные расчетные методы еще не дают возможности однозначно решать эти задачи, а накопленные и, к сожалению, несистематизированные экспериментальные данные не позволяют количественно характеризовать требуемую эффективность с учетом специфики каждого из процессов, а также особенностей и свойств получаемых продуктов. В то же время вероятностный характер процессов контаминации диктует необходимость сравнивать эффективность обработки каждого из материальных потоков для выявления «слабых» мест и принятия решения об их устранении.

Именно для целей количественной характеристики и сравнительной оценки эффективности проведения различных операций, обеспечивающих достижение и поддержание асептических условий, нами предложен и совместно с Г. Е. Скворцовым внедрен в практику работы ряда микробиологических производств показатель асептической эффективности процессов и операций, обеспечивающий возможность комплексного подхода к решению задач асептики [41, 42]:

$$S_{ac} = n_з/n, \tag{216}$$

где S_{ac} — показатель асептической эффективности; $n_з$ — число операций, загрязненных посторонней микрофлорой; n — общее число проведенных операций (например, по стерилизации питательной среды), включенных в анализируемую выборку.

Этот показатель можно использовать при выводе уравнений для количественной (в том числе и сравнительной) оценки эффективности процессов, непосредственно направленных на достижение асептических условий.

Соответствующие уравнения проще получить, если допустить, что наличие даже одного постороннего микроорганизма в обработанном потоке, материале, на внутренних поверхностях оборудования и коммуникаций означает нарушение асептических условий и квалифицируется как низкокачественная операция [41]. Очевидно, что на практике количество контаминированных операций никогда не равно количеству микроорганизмов, попавших с тем или иным потоком. Это объясняется несколькими причинами, в том числе и тем, что, как правило, при проскоке через ту или иную систему, появившемся вследствие нарушения режима обработки или при отказе какого-либо элемента (узла), за устройство, выполняющее функции барьера, проникает несколько микроорганизмов.

Однако для технологических процессов, требующих так называемой абсолютной стерильности (допускается загрязнение лишь одного ферментатора из тысячи загруженных [123]), указанное выше допущение вполне обосновано. Оно обеспечивает более строгий подход к решению задачи и обеспечивает инактивацию посторонней микрофлоры или ее удаление из материального потока с требуемой гарантией. В микробиологии хорошо известны случаи, когда для начала роста популяции достаточно попадания в среду одной клетки [134].

Рассмотрим последовательность получения уравнений для основных процессов, реализуемых при получении чистых культур микроорганизмов.

Расчет эффективности режимов термической стерилизации питательных сред и других жидкостей. С учетом допущения, что количество загрязненных операций равно количеству прошедших через термический барьер микроорганизмов, и в соответствии с полученным в разделе 3 выражением для критерия стерилизации запишем:

$$N = N_0 \exp(-\nabla) = n_э.$$

Исходное количество жизнеспособных спор посторонних микроорганизмов, содержащихся в данном объеме жидкости и подлежащих стерилизации за одну операцию, определяем из соотношения

$$N_0 = x_0 V_р, \tag{217}$$

где x_0 — концентрация жизнеспособных спор посторонних микроорганизмов в жидкости до стерилизации ($\tau = 0$); $V_р$ — объем жидкости, стерилизуемой за одну операцию.

При стерилизации $n_р$ порций жидкости

$$N = x_0 V_р \exp(-\nabla) n_р, \tag{218}$$

$$S_{ас} = x_0 V_р \exp(-\nabla). \tag{219}$$

Очевидно, что для изотермических условий стерилизации

$$S_{ас} = x_0 V_р \exp(-k\tau). \tag{220}$$

Таким образом, значение показателя асептической эффективности в процессах термической стерилизации жидкостей зависит от исходного содержания контаминантов, их термической устойчивости, объема стерилизуемой жидкости и продолжительности воздействия теплового поля. Если учесть полученные в разделе 3 соотношения для расчета критерия стерилизации, то основное уравнение для расчета показателя асептической эффективности при осуществлении процессов термической стерилизации жидкостей можно записать в виде:

$$S_{ас} = x_0 V_р \exp\left[-A \int_0^{\tau} \exp(-E/RT)\, d\tau\right]. \tag{221}$$

Как показывает практический опыт, во многих слу-

чаях удобней пользоваться другой формой уравнения (219):

$$\nabla = 2{,}3 \lg \frac{x_0 V_р}{S_{ас}}. \qquad (222)$$

Таким образом, с помощью уравнений (219), (221) и (222) можно рассчитывать значения критерия стерилизации в зависимости от загрязненности стерилизуемой жидкости, ее объема, термостойкости спор микроорганизмов-загрязнителей и требуемой эффективности процесса стерилизации. Зная эти значения, легко определить по таблицам (типа табл. 10 и 11) соотношения температуры и времени и конкретизировать их в зависимости от имеющихся установок, а также характеристик пара. При определении эффективности различных режимов целесообразно, по-видимому, пользоваться уравнением (222), приняв для расчета константы термической устойчивости спор Bac. stearothermophilus штамм 1518, для которых соответствующие значения удельной скорости гибели и критерия стерилизации приведены в табл. 10 и 11. Приведем несколько примеров.

Пример 1. Известно, что эффективная стерилизация питательной среды в ферментаторе вместимостью 1,5 м³ (коэффициент заполнения 0,7) достигается при режиме: продолжительность нагревания от 100 до 125° С 20 мин; выдержка при 125° С 10 мин; продолжительность охлаждения от 125 до 100° С 25 мин. Концентрация жизнеспособных спор микроорганизмов-загрязнителей в питательной среде $1 \cdot 10^6$ клеток в 1 мл. Требуется обеспечить такую же эффективность стерилизации среды в ферментаторе вместимостью 15 м³ (коэффициент заполнения 0,7), для которого продолжительность отдельных стадий составляет: нагревание от 100 до 130° С — 20 мин, охлаждение от 130 до 100° С — 30 мин. Концентрация жизнеспособных спор микроорганизмов-загрязнителей в питательной среде $1 \cdot 10^5$ клеток в 1 мл.

Решение. 1) На основе данных, приведенных в табл. 10 и 11, определяем значение критерия стерилизации для режима в ферментаторе вместимостью 1,5 м³.

$$\nabla_н = 23{,}2 \cdot \frac{20}{25} \approx 18{,}6; \quad \nabla_{охл} = 23{,}2 \cdot \frac{25}{25} = 23{,}2;$$

$$\nabla_в = 4{,}57 \cdot 10 = 45{,}7; \quad \Sigma\nabla = 18{,}6 + 23{,}2 + 45{,}7 = 87{,}5.$$

2) Находим значение $S_{ас}$ по уравнению (219):

$$S_{ас} = 1 \cdot 10^6 \cdot 1{,}5 \cdot 0{,}7 \cdot 10^6 \cdot \exp(-87{,}5) = 2{,}6 \cdot 10^{-26}.$$

3) Рассчитываем требуемое значение $\Sigma\nabla$ для режима стерилизации среды в ферментаторе вместимостью 15 м³ по уравнению (222):

$$\Sigma\nabla = 2{,}3 \lg \frac{x_0 V_p}{S_{ac}} = 2{,}3 \lg \frac{1 \cdot 10^5 \cdot 15 \cdot 10^6 \cdot 0{,}7}{2{,}6 \cdot 10^{-26}},$$

откуда $\Sigma\nabla = 87$.

4) Для стадий нагревания и охлаждения среды в аппарате вместимостью 15 м³:

$$\nabla_н = 72{,}4 \cdot \frac{20}{30} = 48{,}3; \quad \nabla_{охл} = 72{,}4 \cdot \frac{30}{30} = 72{,}4.$$

Таким образом, на стадиях нагревания и охлаждения обеспечивается величина критерия стерилизации, равная 120,7. Выдержки среды не требуется, но при указанных режимах в аппарате вместимостью 15 м³ не может быть обеспечен интегральный тепловой эффект, характерный для аппарата вместимостью 1,5 м³.

Пример 2. На практике необходимо обеспечить стандартность условий стерилизации питательной среды в аппаратах вместимостью 0,5 и 10 м³. Обсемененность питательной среды постоянна и составляет 10^7 клеток в 1 мл. Тепловые режимы аппаратов следующие. Аппарат вместимостью 0,5 м³: продолжительность нагревания от 100 до 120° С 10 мин; продолжительность охлаждения от 120 до 100° С 15 мин. Для аппарата вместимостью 10 м³ время этих операций соответственно 20 и 30 мин. Для обоих аппаратов необходимо определить продолжительность выдержки при 120° С с целью обеспечения постоянного значения критерия стерилизации 80.

Решение. 1) Определяем значение критерия стерилизации, достигаемое в аппарате вместимостью 0,5 м³.

$$\nabla_н = 7{,}55 \cdot \frac{10}{20} \cong 3{,}8; \quad \nabla_{охл} = 7{,}55 \cdot \frac{15}{20} = 5{,}7.$$

Суммарное значение ∇ на стадиях нагревания и охлаждения 9,5. Необходимо обеспечить на стадии выдержки $\nabla_в = 80 - 9{,}5 = 70{,}5$.

2) Определяем продолжительность выдержки питательной среды:

$$\tau_в = \frac{70{,}5}{1{,}48} = 47{,}6 \text{ мин}.$$

3) Для аппарата вместимостью 10 м³:

$$\nabla_н = 7{,}55 \cdot \frac{20}{20} = 7{,}55; \quad \nabla_{охл} = 7{,}55 \cdot \frac{30}{20} = 11{,}3.$$

Суммарное значение ∇ на стадиях нагревания и охлаждения равно 18,85. Необходимо обеспечить на стадии выдержки $\nabla_в = 80 - 18{,}85 = 61{,}15$.

4) Время выдержки питательной среды в аппарате вместимостью 10 м³:

$$\tau_в = \frac{61{,}15}{1{,}48} = 41{,}5 \text{ мин}.$$

Пример 3. Предварительно в эксперименте показано, что питательная среда, стерилизуемая в аппарате вместимостью 0,1 м³ (коэффициент заполнения 0,7), хорошо сохраняет свои «ростовые» свойства при эффективной инактивации посторонней микрофлоры, исходная концентрация которой в среде 10^5 клеток в 1 мл. Ре-

жим стерилизации: нагревание от 100 до 130° С 5 мин, выдержка при 130° С 3 мин, охлаждение от 130 до 100° С 10 мин. Необходимо обеспечить стандартность воздействия температурно-временного фактора в аппарате вместимостью 1,5 м³ (коэффициент заполнения 0,8) при условии, что максимальная температура, которая может быть достигнута (снижено давление в сети пароснабжения), 118° С. Продолжительность нагревания от 100 до 118° С 9 мин; продолжительность охлаждения от 118 до 100° С 18 мин. Концентрация посторонней микрофлоры в среде 10^3 клеток в 1 мл.

Решение. 1) Определяем суммарное значение критерия стерилизации при стерилизации питательной среды в аппарате вместимостью 0,1 м³.

$$\nabla_н = 72{,}4 \cdot \frac{5}{30} \cong 12; \quad \nabla_{охл} = 72{,}4 \cdot \frac{10}{30} \cong 24; \quad \nabla_в = 14{,}8 \cdot 3 = 44{,}4;$$

$$\Sigma\nabla = 12 + 24 + 44{,}4 = 80{,}4.$$

2) Находим значение S_{ac} по уравнению (219):

$$S_{ac} = x_0 V_р \exp(-\nabla) = 1 \cdot 10^5 \cdot 0{,}1 \cdot 0{,}7 \cdot 10^6 \exp(-80{,}4) = 7 \cdot 10^{-25}.$$

3) Определяем необходимое значение $\Sigma\nabla$ для аппарата вместимостью 1,5 м³ по уравнению (222):

$$\Sigma\nabla = 2{,}3 \lg \frac{x_0 V_р}{S_{ac}} = 2{,}3 \lg \frac{1 \cdot 10^3 \cdot 1{,}5 \cdot 0{,}8 \cdot 10^6}{7 \cdot 10^{-25}} = 76{,}2.$$

4) Оцениваем суммарное значение критерия стерилизации для аппарата вместимостью 1,5 м³:

$$\nabla_н = 4{,}86 \cdot \frac{9}{18} = 2{,}43; \quad \nabla_{охл} = 4{,}86 \cdot \frac{18}{18} = 4{,}86;$$

$$\nabla_н + \nabla_{охл} \cong 7{,}3.$$

5) Находим значение критерия стерилизации, которое надо обеспечить на стадии выдержки:

$$\nabla_в = \Sigma\nabla - 7{,}3 = 76{,}2 - 7{,}3 = 68{,}9.$$

6) Определяем необходимое время выдержки:

$$\tau_в = \frac{\nabla_в}{k_{118\,°C}} = \frac{68{,}9}{1{,}002} = 68{,}9 \text{ мин}.$$

Таким образом, требуемый эффект стерилизации питательной среды в аппарате вместимостью 1,5 м³ при заданных условиях может быть достигнут при продолжительности выдержки около 69 мин.

Задачи типа приведенных примеров постоянно возникают не только на каждом микробиологическом производстве, но и во всех лабораториях, занимающихся разработкой регламентов получения самых различных микробиологических препаратов. Важно лишь подчеркнуть, что количественная оценка эффективности стери-

лизации должна начинаться в лаборатории, а затем продолжаться в проектных институтах и на производстве. Выше для расчетов использовались соотношения, базирующиеся на экспоненциальной зависимости между температурой и продолжительностью ее воздействия.

Вероятностный подход к исследованию процессов термической инактивации микробных популяций (см. раздел 3) позволяет несколько уточнить формулы для расчета показателя асептической эффективности с учетом S-образного вида кривых отмирания. Для переменной температуры стерилизации справедливо соотношение

$$S_{ac} = x_0 V_p \exp(-\nabla)\left[1 + \nabla + \frac{\nabla^2}{2!} + \ldots + \frac{\nabla^{m-1}}{(m-1)!}\right], \quad (223)$$

а для изотермических условий стерилизации

$$S_{ac} = x_0 V_p \exp(-k\tau)\left[1 + k\tau + \frac{(k\tau)^2}{2!} + \ldots + \frac{(k\tau)^{m-1}}{(m-1)!}\right]. \quad (224)$$

Очевидно, что при вероятностном подходе показатель асептической эффективности приобретает более строгий смысл, чем при трактовке его с позиций детерминистических методов. В таких методах предполагается наличие экспоненциальной зависимости между количеством жизнеспособных микроорганизмов и продолжительностью воздействия летального фактора (температура, концентрация химического вещества-деконтаминанта, интенсивность излучения и др.). В уравнениях (223) и (224) экспонента характеризует лишь частный случай, характерный для так называемого одноударного порядка отмирания популяции микроорганизмов. Рассмотрим на примере возможности практического использования уравнения (223).

Пример. В ферментаторе вместимостью 15 м³ стерилизуются 10 м³ питательной среды, содержащей жизнеспособные споры Bac. stearothermophilus, штамм 1518 в концентрации $1 \cdot 10^7$ клеток в 1 мл. Режим стерилизации: нагревание от 100 до 120° С 20 мин; выдержка при 120° С 20 мин; охлаждение от 120 до 100° С 30 мин. Требуется определить значение показателя асептической эффективности при одно-, двух-, трех-, четырехударном и т. д. порядке отмирания популяции.

Решение: 1) Определяем суммарное значение критерия стерилизации, пользуясь данными табл. 10 и 11.

$$\Sigma\nabla = 7{,}5\frac{20}{20} + 1{,}48 \cdot 20 + 7{,}5\frac{30}{20} = 7{,}5 + 29{,}6 + 11{,}3 = 48{,}4.$$

2) Для одноударного порядка:

$$S_{ac} = 10^7 \cdot 10 \cdot 10^6 \exp(-48{,}4) \cong 1 \cdot 10^{-7},$$

т. е. принятый режим стерилизации гарантирует получение не менее 9 999 999 чистых операций из 10^7.

3) Для двухударного порядка:

$$S_{ac} = 1 \cdot 10^{-7}(1 + 48{,}4) = 4{,}9 \cdot 10^{-6}.$$

4) Для трехударного порядка:

$$S_{ac} = 1 \cdot 10^{-7}\left[1 + 48{,}4 + \frac{(48{,}4)^2}{2}\right] \cong 1{,}2 \cdot 10^{-4},$$

5) Для четырехударного порядка:

$$S_{ac} = 1 \cdot 10^{-7}\left[1 + 48{,}4 + \frac{(48{,}4)^2}{2} + \frac{(48{,}4)^3}{6}\right] = 2 \cdot 10^{-3},$$ т. е.

при четырехударном порядке отмирания популяции могут быть контаминированы 2 ферментатора из 1000.

Таким образом, изменение порядка отмирания популяции от одноударного до четырехударного снижает эффективность принятого режима стерилизации в $\frac{2 \cdot 10^{-3}}{1 \cdot 10^{-7}}$ раз, т. е. примерно в 10 000 раз.

Этот пример свидетельствует о чрезвычайной важности экспериментального определения порядка отмирания (одно- или многоударный) тех встречающихся в заводской практике популяций микроорганизмов, от эффективности термической обработки которых зависит успех реализации соответствующих технологических операций (стерилизация питательных сред, пеногасителей, жидких добавок и др.). Следует еще раз указать на недопустимость довольно распространенной на практике экстраполяции данных по режимам стерилизации, получаемых в лабораториях при изучении процессов отмирания популяций микроорганизмов в разбавленных, гомогенных суспензиях, на заключительный этап термической стерилизации, определяющий, по существу, эффективность режима стерилизации в целом. Оставшиеся единичные микроорганизмы, наличием которых работники лабораторий часто пренебрегают или прогнозируют их инактивацию по аналогии с основной массой спор, являются наиболее термостойкими, что требует значительного увеличения продолжительности стерилизации. Вполне объяснимы с этой точки зрения известные из литературы многочисленные неудачи с масштабированием процессов стерилизации, когда режимы, обеспечи-

вающие гарантированную инактивацию посторонней микрофлоры, но отработанные на малых объемах жидкостей (в ограниченном числе экспериментов и, следовательно, не характеризующие свойств биологической системы в целом), переносят на значительные объемы микробных популяций, характерных для микробиологических производств. Особенности этих производств неизбежно приводят к двух-, трехкратному и более увеличению продолжительности выдержки при температуре стерилизации по сравнению с той продолжительностью, которая была получена и оценивалась как вполне достаточная в лабораторных условиях.

В тех случаях, когда увеличение продолжительности стерилизации при данной температуре и соблюдение требуемого значения показателя асептической эффективности приводят к ухудшению ростовых свойств питательной среды или снижению полноценности других жидкостей, вводимых в ферментаторы, необходимо увеличивать температуру при одновременном сокращении времени выдержки в соответствии с рекомендациями, изложенными в разделе 3. В более общем случае следует констатировать, что в лабораторных условиях недостаточно объективно фиксируются значения интегрального теплового эффекта, действительно обеспечивающего гарантированную инактивацию посторонней микрофлоры в жидкостях, характерных для микробиологической технологии. Одной из причин такого положения является недостаточное внимание со стороны исследователей и практиков к расчетным методам количественной характеристики эффективности режимов стерилизации. Вторая причина заключается в отсутствии необходимого объема информации о кинетических характеристиках процессов инактивации микроорганизмов и процессов разрушения компонентов стерилизуемых жидкостей под влиянием температурно-временно́го фактора.

Необходимо отметить, что вероятностный подход к изучению кинетики отмирания микроорганизмов в тепловом поле, к обоснованию и количественной оценке требуемой эффективности режимов термической стерилизации предъявляет более строгие требования к методике проведения соответствующих исследований. При этом на первый план выдвигается не только определение констант термической устойчивости микроорганиз-

мов, но и изучение формального порядка отмирания популяции в представительных выборках, объективно отражающих гетерогенность исследуемых микробных популяций по признаку терморезистентности. Последняя зависит не только от свойств данной культуры микроорганизмов, но и от особенностей технологии обработки тех или иных жидкостей. Например, для питательной среды важно наличие или отсутствие твердых включений, защитных пленок, скоплений микроорганизмов и др. Для растворов сахаров исключительную роль играют pH среды и концентрация сахара.

Стерилизация воздуха методом фильтрации. В разделе 11 отмечалось, что эффективность стерилизации воздуха в фильтрах тонкой очистки принято характеризовать по величине коэффициента проскока $K_п$, определяемого в некоторых случаях с помощью бактериальных аэрозолей:

$$K_п = \frac{x}{x_0} \cdot 100$$

или

$$K_п = \frac{xV_в}{x_0V_в} \cdot 100, \qquad (225)$$

где $V_в$ — объем воздуха, поступившего в фильтр за данный период времени.

Очевидно, что произведение $xV_в$ представляет собой количество микроорганизмов, прошедших через фильтр с объемом воздуха $V_в$ и определяющих в соответствии с принятым нами допущением число операций, загрязняемых посторонней микрофлорой, т. е.

$$xV_в = N.$$

Таким образом

$$N = K_п x_0 V_в 10^{-2}. \qquad (226)$$

Для процесса культивирования:

$$V_в = V_р g_в \tau_а, \qquad (227)$$

где $g_в$ — удельный минутный расход воздуха; $\tau_а$ — продолжительность аэрации культуральной жидкости.

С учетом соотношения (227):

$$S_{ас} = K_п x_0 V_р g_в \tau_а \cdot 10^{-2}. \qquad (228)$$

С помощью уравнения (228) можно решать практические задачи, связанные с определением необходимого

значения коэффициента проскока фильтра или группы фильтров, который может обеспечить требуемую величину показателя асептической эффективности. Из уравнения (228) следует, что одинаковые значения коэффициента проскока фильтра не гарантируют достижение равного количества чистых операций при изменении исходной обсемененности воздуха, объема аэрируемой жидкости, удельного расхода воздуха и продолжительности аэрации. Таким образом, данный коэффициент нельзя использовать как параметр масштабного перехода при необходимости обеспечения равной эффективности очистки воздуха в лабораторных установках и аппаратах экспериментальных производств.

Рассмотрим возможности практического использования уравнения (228) на примерах.

Пример 1. Необходимое значение показателя асептической эффективности обеспечивается в ферментаторе вместимостью $V_р = 1$ м^3 при удельном минутном расходе $g_в = 0{,}5$ об/(об·мин), продолжительности аэрации $\tau_а = 30$ ч и исходной обсемененности воздуха $x_0 = 100$ клеток в 1 м^3. $K_п$ по бактериальному аэрозолю равен $1 \cdot 10^{-5}$%. Требуется обеспечить такую же эффективность очистки воздуха в аппарате с $V'_р = 10$ м^3 при удельном расходе $g'_в = 0{,}6$ об/(об·мин), исходной обсемененности воздуха $x'_0 = 1000$ клеток в 1 м^3 и продолжительности аэрации $\tau'_а = 100$ ч.

Решение. 1) Необходимое значение $K_п$ определяем из условия

$$S_{ас} = \text{const}.$$

2) Из уравнения (228) следует, что

$$K_п x_0 V_р g_в \tau_а = K'_п x'_0 V'_р g'_в \tau'_а,$$

откуда

$$K'_п = K_п \frac{x_0 V_р g_в \tau_а}{x'_0 V'_р g'_в \tau'_а} = K_п \frac{100 \cdot 1 \cdot 0{,}5 \cdot 30}{1000 \cdot 10 \cdot 0{,}6 \cdot 100} = 1 \cdot 10^{-5} \cdot 2{,}5 \cdot 10^{-3} =$$

$$= 2{,}5 \cdot 10^{-8}\ \%.$$

Итак, при переходе от ферментатора вместимостью 1 м^3 к ферментатору вместимостью 10 м^3 и изменившихся условиях для обеспечения равного количества чистых операций требуется установка фильтра, имеющего коэффициент проскока не ниже $2{,}5 \cdot 10^{-8}$%.

Пример 2. При проектировании монтажной схемы ферментатора вместимостью 2 м^3 (коэффициент заполнения 0,7) требовалось сравнить эффективность двух процессов: термической стерилизации питательной среды в ферментаторе и стерилизации воздуха методом фильтрации. В первом случае из регламента приняли режим: нагревание питательной среды от 100 до 123°С 10 мин, выдержка при 123° С 15 мин; охлаждение от 123 до 100° С 20 мин. Обсемененность 10^5 клеток в 1 мл.

Требуется подобрать характеристику задерживающей эффективности фильтра, которая обеспечивала бы достижение принципа равной эффективности. Условия: загрязненность воздуха посторонней микрофлорой 10^4 клеток в 1 м^3; удельный расход воздуха 1 об/(об·мин); продолжительность аэрации культуральной жидкости 50 ч. Загрязненность воздуха и удельный расход в течение всего периода аэрации постоянные.

Решение. 1) Определяем значение показателя асептической эффективности для режима термической стерилизации питательной среды:

$$\triangle_н = 14{,}9 \cdot \frac{10}{23} = 6{,}4; \quad \nabla_в = 3 \cdot 15 = 45; \quad \nabla_{охл} = 14{,}9\frac{20}{23} = 12{,}8;$$

$$\Sigma\nabla = 64{,}2.$$

$$S_{ас} = x_0 V_р \exp(-\nabla) = 1 \cdot 10^5 \cdot 10^6 \cdot 14 \exp(-64{,}2) = 3{,}5 \cdot 10^{-6}.$$

2) По условию задачи для обоих процессов $S_{ас} = \text{const}$. Находим по уравнению (228), решенному относительно $K_п$, требуемое значение коэффициента проскока фильтра:

$$K_п = \frac{S_{ас}}{x_0 V_р g_в \tau_а \cdot 10^{-12}} = \frac{3{,}5 \cdot 10^{-6}}{10^4 \cdot 10 \cdot 1 \cdot 60 \cdot 50 \cdot 10^{-12}} = 1{,}16 \cdot 10^{-12}.$$

Таким образом, выполнение принципа равной эффективности может быть обеспечено при установке фильтра с коэффициентом проскока не ниже $1{,}16 \cdot 10^{-12}$.

Приведенные примеры указывают на существенную зависимость числа чистых операций от фактического значения коэффициента проскока фильтров и на необходимость проверки каждого фильтра перед его установкой на линию стерильного сжатого воздуха. Такая проверка должна осуществляться микробиологическими лабораториями предприятия на специальных стендах. Каждый проверенный фильтр должен иметь паспорт с указанием даты проверки, значения коэффициента проскока и даты повторной проверки. При необходимости фильтры можно проверять и непосредственно на месте установки.

Герметизация оборудования и коммуникаций. Рассмотрим возможности использования показателя асептической эффективности при формулировании требований к необходимой степени герметизации оборудования и коммуникаций, работающих в асептических условиях. При эксплуатации ферментаторов и других аппаратов наиболее опасна ситуация, при которой во внутренних полостях создается некоторое разрежение, способствующее поступлению потока загрязненного посторонней микрофлорой воздуха из окружающей среды в аппараты

и коммуникации. Такие ситуации часто возникают на микробиологических предприятиях при охлаждении аппаратов после термической стерилизации, особенно в тех случаях, когда аппаратчик допустил падение давления в простерилизованном ферментаторе. Количество посторонней микрофлоры, поступившей в аппарат через неплотности, зависит от многих факторов:

$$N = f(d_{экв}, v_н, x_в, \tau_н), \tag{229}$$

где N — количество микроорганизмов-загрязнителей; $d_{экв}$ — эквивалентный диаметр неплотности, $v_н$ — скорость натекания воздуха; $x_в$ — обсемененность воздуха посторонней микрофлорой; $\tau_н$ — продолжительность натекания воздуха.

Количество воздуха, поступающего за период времени $\tau_н$ в аппарат, равно:

$$G = \frac{\pi d_{экв}^2}{4} v_н \tau_н, \tag{230}$$

где G — количество воздуха.

Общее количество микроорганизмов, которое может поступить за n циклов в аппарат при времени создания разрежения в аппарате, равном $\tau_н$ часам, составит:

$$N = x_в \cdot 0{,}785 d_{экв}^2 v_н \tau_н n, \tag{231}$$

откуда

$$S_{ас} = 0{,}785 x_в d_{экв}^2 v_н \tau_н. \tag{232}$$

Уравнение (232) можно использовать для ориентировочного расчета допустимого эквивалентного диаметра неплотностей в аппаратах и коммуникациях, который при известной обсемененности воздуха рабочих помещений посторонней микрофлорой, продолжительности поддержания разрежения в аппарате и скорости поступления воздуха обеспечит требуемое значение показателя асептической эффективности:

$$d_{экв} \leqslant \sqrt{\frac{4S_{ас}}{\pi x_в v_н \tau_н}}. \tag{233}$$

Оценим на примере, близком к практическим условиям работы производственных ферментаторов, ориентировочное значение $d_{экв}$ по уравнению (233).

Пример. В ферментаторе должна быть обеспечена так называемая абсолютная стерильность ($S_{ас} = 0{,}001$) при условии: обсемененность окружающего воздуха 10^4 клеток в 1 м^3; скорость на-

текания воздуха 20 м/с; продолжительность натекания 1 ч. Требуется определить допустимое значение $d_{экв}$.

Решение. Находим, что при заданных условиях

$$d_{экв} \leqslant \sqrt{\frac{4 \cdot 10^{-3}}{\pi 10^4 \cdot 20 \cdot 3600 \cdot 5}} = 5{,}9 \cdot 10^{-7} \text{ м} = 0{,}59 \text{ мкм}.$$

Для получения более точных данных необходимо практически определить значения величин, входящих в уравнение (233).

В этом примере диаметр неплотности оказался одного порядка с величиной единичных микроорганизмов, находящихся в воздухе лабораторных и производственных помещений. Однако следует иметь в виду, что при рассмотрении явления проскока посторонних микроорганизмов через неплотности в аппаратах и коммуникациях, а также герметизирующие элементы необходимо учитывать и характер неплотностей. Например, появляющиеся в металле микротрещины имеют сложную конфигурацию и никогда не могут быть сравнены по своей геометрии с трубкой диаметром $d_{экв}$. Эти особенности позволяют предположить, что микроорганизм, попавший в такую неплотность, на своем пути может быть задержан за счет касания или оседания, вследствие чего вероятность проскока в стерильный аппарат снижается.

Учитывая последнее замечание, полезно оценить метод проверки оборудования на герметичность с помощью галоидного течеискателя, который широко распространен в микробиологической промышленности. Степень герметизации, гарантируемая этим методом, допускает утечку галоидсодержащего вещества в количестве 0,2—0,5 г в год в зависимости от типа течеискателя. Ориентировочно оценим предельный эквивалентный диаметр неплотности для четыреххлористого углерода, определяемый с помощью течеискателя. Например, при условиях проверки в 1 м^3 воздуха, заключенного в испытуемом объеме, находится 10 мл четыреххлористого углерода, относительная плотность которого 1,6 г/см^3. Таким образом, в 1 м^3 воздуха находится 16 г четыреххлористого углерода, а 0,5 г содержится в 31 л воздуха. Следовательно, с помощью этого метода обнаруживаются такие неплотности, через которые натекает не более 31 л воздуха в год. Определим эквивалентный диаметр неплотностей:

$$d_{экв} = \sqrt{\frac{4V_в}{\pi v_н \tau_н}}, \qquad (234)$$

где $V_в$ — объем воздуха, равный 0,031 м^3; $v_н$ — скорость натекания, равная 30 м/с; $\tau_н$ — продолжительность натекания, равная 365 сут.

$$d_{экв} = \sqrt{\frac{4 \cdot 0{,}031}{30 \cdot 3600 \cdot 365 \cdot 24}} = \sqrt{\frac{1{,}2 \cdot 10^{-1}}{2{,}96 \cdot 10^{9}}} = \sqrt{\frac{1{,}2}{0{,}297} \cdot 10^{-11}} =$$

$$= 6{,}35 \cdot 10^{-6} \text{ м} = 6{,}35 \text{ мкм}.$$

Этот пример ориентировочного расчета позволяет заключить, что метод с использованием галоидного течеискателя позволяет обнаруживать неплотности, эквивалентный диаметр которых имеет тот же порядок, что и диаметр реальных частиц, несущих микроорганизмы в потоке воздуха лабораторных и производственных помещений. Необходимо еще раз подчеркнуть, что неплотности в аппаратах и коммуникациях, как правило, имеют исключительно сложную конфигурацию, а не являются каналами с постоянным сечением. По-видимому, именно эта особенность служит одним из факторов, обеспечивающих приемлемость галоидных течеискателей для проверки степени герметизации оборудования и коммуникаций, которые работают в асептических условиях.

Общая оценка эффективности. Итоги рассмотрения проблемы получения чистых культур микроорганизмов на уровне отдельных процессов, а также аппаратов и технических систем, в которых эти процессы реализуются, позволяют сделать вывод об исключительной сложности задач, возникающих в практике на всех этапах создания и эксплуатации соответствующих технических устройств. Появляется необходимость рассмотрения своеобразных биологоинженерных комплексов, для которых наряду с количественной характеристикой аппаратов и реализуемых в них режимов необходимо дать количественную характеристику поведения популяций микроорганизмов.

Даже на лабораторном уровне, на котором операции и процессы, связанные с достижением асептических условий, проводятся в отдельных специализированных устройствах, имеющих незначительные размеры и не объединяемых в технические системы, проблема получе-

ния гарантированно чистых культур микроорганизмов не представляется достаточно простой. К каждой операции и каждому процессу должны быть сформулированы количественные требования по эффективности, которые бы с заданной вероятностью гарантировали отсутствие контаминантов в воздухе, оборудовании, питательной среде и др. Ясно, что требования к эффективности работы различных технических устройств (например, фильтров для очистки воздуха методом фильтрации) или эффективности реализации различных режимов (например, термической стерилизации жидкостей) могут существенно меняться в зависимости от масштабов аппаратов (переход от ферментатора вместимостью 1 м^3 к ферментатору вместимостью 10 м^3) и (или) характеристик исходных материальных потоков (объем питательной среды, расход воздуха, их обсемененность, длительность подачи воздуха в ферментатор и др.).

Чем бóльшее количество процессов и операций определяет возможность получения чистых культур микроорганизмов, тем с большей эффективностью должны осуществляться эти процессы. Очевидно, что с учетом формул (213) и (216)

$$(1 - S_{ac}^{об}) = (1 - S_{ac_1})(1 - S_{ac_2})(1 - S_{ac_3})(1 - S_{ac_4}) \times \\ \times (1 - S_{ac_5})(1 - S_{ac_6}), \qquad (235)$$

где $S_{ac}^{об}$ — общий показатель асептической эффективности процесса получения чистых культур микроорганизмов; $S_{ac_{1-6}}$ — показатель асептической эффективности отдельных процессов: S_{ac_1} — герметизации оборудования и коммуникаций; S_{ac_2} — термической стерилизации оборудования и коммуникаций; S_{ac_3} — термической стерилизации питательных сред, S_{ac_4} — термической стерилизации пеногасителя, S_{ac_5} — стерилизации воздуха; S_{ac_6} — стерилизации растворов добавок.

Поскольку выше была показана необходимость достижения равной эффективности реализации всех процессов, непосредственно определяющих получение чистых культур, то

$$1 - S_{ac}^{об} = (1 - S_{ac_i})^n. \qquad (236)$$

Рассмотрим влияние увеличения количества процессов на эффективность их реализации при постоянном значении $S_{ac}{}^{об}$.

Пример. Процесс получения чистых культур микроорганизмов обеспечивается при реализации трех процессов: герметизации и стерилизации оборудования и коммуникаций, стерилизации оборудования и коммуникаций, стерилизации питательной среды. $S_{ac}^{об} = 0{,}01$. Необходимо определить асептическую эффективность этих процессов и ее изменение при добавлении процессов стерилизации воздуха, жидких добавок и пеногасителя.

Решение. 1. Находим частное значение показателя асептической эффективности для варианта трех процессов. Очевидно, что в этом случае

$$1 - S_{ac_i} = \sqrt[3]{1 - S_{ac}^{об}} = \sqrt[3]{0{,}99}\ ; \quad S_{ac} \cong 0{,}004.$$

2) По аналогии с 1) находим частное значение показателя асептической эффективности для варианта шести процессов.

$$S_{ac} \approx 1 - \sqrt[6]{0{,}99} \approx 0{,}002.$$

Таким образом, введение в монтажные схемы аппаратов, работающих в асептических условиях, дополнительных материальных потоков приводит к необходимости повышения эффективности деконтаминации каждого из потоков.

Мы рассмотрели лишь один из возможных методических подходов к комплексному рассмотрению совокупности процессов, обеспечивающих получение чистых культур микроорганизмов или достижение асептических условий в аппаратах и коммуникациях различных микробиологических производств. Такой подход базируется на количественной оценке эффективности этих процессов, в том числе и сравнительной, направленной на выявление так называемых «слабых» режимов элементов и узлов. Необходимость решения последней задачи представляется нам исключительно важной, поскольку самые передовые решения в отношении реализации одних процессов (например, стерилизации и герметизации оборудования) могут быть сведены на нет при недостаточной эффективности других процессов (очистка воздуха методом фильтрации, открытый посев или отбор проб из аппаратов). В этом плане сравнительная количественная оценка эффективности разнородных по своему внутреннему содержанию процессов должна рассматриваться как совершенно необходимый шаг в развитии научно-прикладной проблемы получения как чистых культур микроорганизмов, так и чистых микробиологических препаратов в технологии микробиологических производств.

13.2. Внешняя задача

Постановка вопроса. Эффективность режимов работы технических систем, обеспечивающих выполнение требований профсанитарии, в принципе, можно оценить как расчетными, так и экспериментальными методами. Однако современный уровень «отработанности» тех и других методов еще далек от совершенства и обеспечивает возможность оценить эффективность лишь приблизительно. Среди расчетных методов лучше разработаны методы оценки эффективности режимов термической обработки, характерных для различных автоклавов, систем обработки стоков, аппаратов периодического действия, которые предназначены для инактивации отходов производства. Практически отсутствуют методы, которые позволяли бы расчетным путем сравнивать эффективность работы различных систем и выявлять наиболее «слабые» из них с целью принятия обоснованных решений по совершенствованию как режимов, так и самих технических устройств. Мы рассмотрим один из возможных путей создания таких методов, необходимых уже на этапе проектирования систем профсанитарии.

Анализ литературы показывает, что требуемую эффективность процессов, осуществляемых в инженерных системах защиты внешней среды от производственных вредностей, принципиально можно оценить несколькими путями. Один из них предусматривает экспериментальное определение и задание в качестве нормативного показателя предельно допустимого количества БАЧ (по каждому продукту), которые, проникая во внешнюю среду с каждым из материальных потоков в течение определенного промежутка времени, в последующем не приводят к каким-либо нежелательным последствиям, т. е. не являются вредными для окружающей среды.

Именно такой подход, базирующийся на результатах экспериментальных исследований в лабораториях и обобщения опыта многолетней эксплуатации лабораторных и производственных корпусов, представляется наиболее объективным и позволяет судить о действительно необходимой эффективности обработки различных материальных потоков. Однако современное состояние теоретических и экспериментальных разработок в этой области таково, что еще не позволяет использовать первый

путь для определения требуемой эффективности инженерных систем профсанитарии. Отсутствуют систематизированные количественные характеристики практически каждого из материальных потоков. Накопление необходимых статистических данных еще только началось.

Возможен и путь, который предполагает задание вероятности проскока БАЧ с каждым из материальных потоков на основе теоретических расчетов. Успешное исследование сложных систем (к ним, несомненно, относятся и интересующие нас технические системы профсанитарии) возможно лишь при использовании методов теории вероятностей [116]. Применение этого подхода на практике в настоящее время ограничивается некоторыми объективными причинами. Отметим, что интенсивность различных материальных потоков и степень их загруженности БАЧ различны, вследствие чего за один и тот же промежуток времени в отдельных потоках обработке будет подвергаться различное количество БАЧ. Например, в воздухе помещений, где установлены сепараторы для концентрирования культуральной жидкости при получении энтомопатогенных препаратов (энтобактерин, дендробацилин и др.), концентрация микроорганизмов может достигать $1 \cdot 10^5$ клеток в 1 м^3. В то же время в помещениях цеха ферментации концентрация микроорганизмов в воздухе на несколько порядков ниже. Очевидно, что при задании конкретных значений вероятности проскока такие различия следует учитывать.

По-видимому, равная вероятность проскока для рассматриваемых материальных потоков не обеспечит равной эффективности защиты внешней среды и из-за различного механизма воздействия БАЧ из различных потоков на внешнюю среду. Можно также предполагать, что для вегетативных и споровых форм микроорганизмов, очевидно, могут быть заданы различные значения вероятности проскока в силу существенно отличающейся устойчивости к воздействию факторов внешней среды. Без учета всего комплекса параметров и показателей, влияющих на выбор-обоснование конкретных значений вероятности проскока БАЧ, можно допустить две ошибки. При задании заниженного по сравнению с требуемым значения вероятности проскока все системы проф-

санитарии окажутся фактически неработоспособными и непригодными для выполнения возложенных на них функций. Значения вероятности проскока могут оказаться настолько завышенными, что их реализация в конкретных инженерных решениях не представится возможной по соображениям как технического, так и экономического характера. Очевидно, что та и другая ошибки недопустимы, учитывая современные требования к микробиологическим производствам. Поэтому теоретический расчет необходимого значения вероятности проскока БАЧ, гарантированно обеспечивающей защиту персонала и внешней среды от специфических вредностей микробиологических производств по каждому из материальных потоков, в настоящее время не представляется возможным.

В то же время потребности существующих и проектируемых микробиологических производств постоянно ставят задачу создания таких инженерных систем, которые обеспечили бы выполнение требований профсанитарии по защите персонала и окружающей среды от БАЧ, характерных для каждого конкретного лабораторного и производственного корпуса. Анализ накопленных экспериментальных данных показывает, что в сложившихся условиях для оценки требуемой эффективности процессов обработки материальных потоков можно использовать экспериментально-расчетный путь. Для его реализации необходимо знать эффективность одной из действующих инженерных систем защиты внешней среды от БАЧ. При этом нужно учитывать такие результаты многолетней эксплуатации системы, которые позволяли бы однозначно судить о действительно достаточной эффективности конкретных режимов обработки, обеспечивающих безопасную эксплуатацию системы (т. е. реально существующий и количественно охарактеризованный проскок не привел в течение продолжительного срока наблюдения к нежелательным последствиям во внешней среде и не оказал вредного воздействия на здоровье работающего персонала). Желательно также, чтобы эти данные легко проверялись экспериментальным путем при постановке достоверной серии опытов и последующей количественной оценке эффективности режимов работы.

Следующим необходимым шагом в практической

реализации результатов, полученных при анализе эффективности работы одной из систем профсанитарии, является применение принципа равной эффективности, допускающего для каждой из систем проникновение во внешнюю среду одинакового количества БАЧ в течение определенного (равного для всех систем) промежутка времени. Применение этого принципа является вынужденным, оно вытекает из современного уровня изученности проблемы защиты внешней среды от БАЧ, в том числе и из-за отсутствия статистически достоверных данных о фактическом воздействии на окружающую среду разных по свойствам БАЧ, поступивших в нее с различными материальными потоками микробиологических производств.

Однако современная практика работы с многочисленными продуктами микробиологических производств требует надежной защиты внешней среды от БАЧ, т. е. создания комплекса специализированных технических устройств и систем, гарантированно предупреждающих вынос БАЧ за пределы лабораторных и производственных корпусов в количествах, которые могут привести к нежелательным последствиям. Именно это вынуждает исследователей и практиков заниматься разработкой методов, которые позволили хотя бы ориентировочно оценивать требуемую эффективность режимов работы указанных устройств и систем. Применение принципа равной эффективности является одним из методических приемов, позволяющих получить необходимые расчетные уравнения. Его практическое использование означает, что, если при работе системы обработки стоков допускается попадание во внешние сети одной БАЧ в месяц, то и для каждой системы пропускников, передаточных устройств, очистки технологического и вентиляционного воздуха необходимо соблюдать эти условия.

В данном случае под системой понимается совокупность различных технических устройств, аппаратов и КИП, обеспечивающих обработку материального потока. С этой точки зрения в системе вентиляции исследовательского или производственного корпуса следует различать несколько подсистем (как приточных, так и вытяжных), обеспечивающих обслуживание различных групп помещений с отличающимися характеристиками загрязненности воздуха БАЧ. В системе передаточных

устройств в качестве подсистемы удобно рассматривать каждый из аппаратов обработки передаваемых предметов, в системе пропускников — пропускники для женщин и мужчин. Аналогичные рассуждения можно продолжить и применительно к остальным инженерным системам, обеспечивающим обработку материальных потоков. Следует лишь отметить, что деление систем на подсистемы и далее на элементы и узлы — процедура условная, определяемая в каждом конкретном случае удобством рассмотрения поставленных задач. Например, если изучается эффективность работы системы вытяжной вентиляции, то отдельные вентиляционные камеры можно рассматривать в качестве элементов. При обсуждении вопросов эффективности одной из таких камер она сама может рассматриваться в качестве системы, а элементами будут входящие в состав камеры различные технические устройства (корпус, фильтрующие элементы и др.).

Очевидно, что принцип равной эффективности с учетом сделанных замечаний предполагает для любого из интересующих нас исследовательских и производственных корпусов наличие следующего равенства:

$$\sum_{w=1}^{W} M_w = \sum_{j=1}^{J} M_j = \sum_{i=1}^{I} M_i = \sum_{p=1}^{P} M_p = \sum_{d=1}^{D} M_d = \sum_{n=1}^{N} M_n, \quad (237)$$

где ΣM_w — количество БАЧ, проникающих во внешнюю среду через систему термической обработки стоков; W — индекс, характеризующий количество подсистем обработки стоков; ΣM_j — количество БАЧ, проникающих во внешнюю среду через устройства системы очистки технологического воздуха; j — индекс, характеризующий количество подсистем очистки технологического воздуха, для коллекторной системы $j=1$; ΣM_i — количество БАЧ, проникающих во внешнюю среду через систему вентиляции; i — индекс, характеризующий количество подсистем вентиляции; ΣM_p — количество БАЧ, проникающих во внешнюю среду через передаточное устройство; p — индекс, характеризующий количество передаточных устройств; ΣM_d — количество БАЧ, проникающих во внешнюю среду через систему пропускника; d — индекс, характеризующий количество подсистем пропускников; ΣM_n — количество БАЧ, проникающих во внешнюю среду через неплотности строительных конструкций корпуса; n — количество неплотностей — потенциальных источников БАЧ.

В соответствии с избранным направлением ниже излагается последовательность получения аналитических зависимостей для сравнительной оценки эффективности процессов термической обработки стоков, очистки

вентиляционного и технологического воздуха, обработки различных предметов. Что касается оценки эффективности герметизации здания и функционирования пропускников, то они должны быть предметом самостоятельного исследования. Совершенно очевидно, что количество БАЧ, выносимых за пределы корпуса с различными материальными потоками, должно определяться для фиксированного промежутка времени.

Термическая обработка стоков. При существующем уровне изученности соответствующих режимов обработки материальных потоков наиболее полно, по нашему мнению, отвечает требованиям, изложенным выше, процесс термической обработки стоков, содержащих термостойкие споры микроорганизмов. Во-первых, в этой области уже накоплен достаточно обширный экспериментальный материал. Такие данные, с одной стороны, позволяют количественно оценить эффективность реализованных в натуре инженерных систем и опробованных режимов, а с другой, на основе практики (в том числе и в промышленном масштабе) сделать вывод о достаточности или недостаточности этих режимов для гарантированного предупреждения нежелательных последствий во внешней среде. Во-вторых, именно процесс термической стерилизации стоков легко контролируется по обеспеченности заданных режимов его ведения (сочетание температуры и времени выдержки), а также по эффективности инактивации БАЧ (отбор и анализ представительных проб). Наконец, малочисленные экспериментальные данные количественной оценки эффективности режима обработки могут без особых сложностей дополняться постановкой необходимого числа опытов на лабораторном оборудовании.

Очевидно, что

$$V_{ст} = G_{ст} \cdot \tau_{п}, \tag{238}$$

а общее количество БАЧ в них

$$M^0_{ст} = x^0_{ст} \cdot 10^6 \cdot G_{ст} \cdot \tau_{п}, \tag{239}$$

где $G_{ст}$ — расход стоков, $x^0_{ст}$ — концентрация БАЧ в стоках до термической обработки; $V_{ст}$ — количество стоков, термически обработанных в системе за период времени $\tau_{п}$.

Как уже отмечалось, при термическом методе обработки эффективность режимов можно охарактеризовать

с помощью безразмерного критерия стерилизации, фиксирующего в рассматриваемом случае убыль общего количества БАЧ в стоках после термического воздействия. С учетом уравнений (238) и (239) условие «безвредности» стоков:

$$\ln \frac{M^0_{ст}}{M} = \ln \frac{x^0_{ст} \cdot 10^6 \cdot G_{ст} \tau_п}{M} \geqslant \nabla_{эксп}, \qquad (240)$$

где $\nabla_{эксп}$ — экспериментально обоснованное значение критерия стерилизации, обеспечивающее эффективную обработку стоков.

Из уравнения (240) определим максимально допустимое количество БАЧ:

$$M_{max} = x^0_{ст} \cdot 10^6 \cdot G_{ст} \cdot \tau_п \exp(-\nabla). \qquad (241)$$

Если речь идет о спорах с известными константами термической устойчивости, то значение критерия стерилизации можно рассчитать путем ступенчатого интегрирования соотношения (59).

Для режимов термообработки при переменной температуре

$$M_{max} = x^0_{ст} \cdot 10^6 G_{ст} \cdot \tau_п \exp\left[-A \int_0^{\tau} \exp(-E/RT)\, d\tau \right]. \qquad (242)$$

Таким образом, количество БАЧ, выносимых за термический барьер со стоками во внешнюю среду, зависит от расхода стоков, их обсемененности, констант термической устойчивости спор и режима термической обработки. Уравнение (242) не учитывает в явном виде влияние pH среды, однако константы термоустойчивости микроорганизмов, используемых в качестве тест-объектов, определяют, как правило, при нейтральных значениях pH, т. е. для условий, когда скорость отмирания минимальная. Следовательно, в самих значениях констант термической устойчивости, используемых в расчетах, обеспечивается известный запас эффективности обработки сточных вод.

Уравнения (241) и (242) можно использовать для расчета требуемых режимов термической обработки стоков (сочетание температуры и времени выдержки), гарантирующих достижение необходимого значения M при экспоненциальном характере отмирания популяции. Для таких расчетов и выбора возможных и целесооб-

разных для данного конкретного случая режимов термической обработки стоков, а также сокращения расходов на проведение многочисленных экспериментальных работ необходимо по известным методикам определить константы термической устойчивости спор и формальный порядок отмирания популяции. При этом надо обращать особое внимание на отклонение кривой $M=f(\tau)$ от традиционной, но (как показано в разделе 3) не во всех случаях справедливой экспоненциальной зависимости.

При отмирании популяции микроорганизмов по S-образной кривой расчет следует вести по уточненным уравнениям (см. раздел 3). Для постоянной температуры:

$$M = M^0_{\text{ст}} \exp(-k\tau)\left[1 + k\tau + \frac{(k\tau)^2}{2!} + \ldots + \frac{(k\tau)^{m-1}}{(m-1)!}\right]. \quad (243)$$

Для переменной температуры:

$$M = M^0_{\text{ст}} \exp(-\nabla)\left[1 + \nabla + \frac{\nabla^2}{2!} + \ldots + \frac{\nabla^{m-1}}{(m-1)!}\right]. \quad (244)$$

Если показатели термической устойчивости отсутствуют, то примерное значение M можно рассчитать на основе экспериментальных данных, подтверждающих, что заданным режимом обработки обеспечивается практически приемлемая степень инактивации спор, а выходящие за термический барьер стоки для внешней среды неопасны. Такой расчет сугубо ориентировочный, поскольку без знания кинетики отмирания микроорганизмов и при интервальном методе отбора проб невозможно установить точное время полного отмирания данной популяции. Рассмотрим последовательность расчета M на примерах.

Пример I. В процессе эксплуатации реальной системы установлено, что эффективная обработка стоков, содержащих споры Bac. thüringiensis var. galleriae, достигается при режиме: выдержка 10 мин при 125° С. Эти данные получены при непрерывной обработке стоков паром и расходе стоков 5 м^3/ч, содержании в них $1 \cdot 10^5$ спор в 1 мл. Общий срок непрерывной эксплуатации системы, в течение которого она являлась надежным барьером на пути проникновения производственных вредностей за пределы корпуса, равен 150 сут. Для оценки эффективности данного режима обработки можно принять характеристики термической устойчивости спор Bac. stearothermophilus штамм 1518 (приведенные в табл. 10 и 11).

Решение. 1) Определяем значение критерия стерилизации при принятом режиме термической обработки стоков:

$$\nabla = k\tau; \quad \nabla = 4{,}5 \cdot 10 = 45$$

2) Полученное значение, а также исходные данные подставляем в уравнение (241):

$$M = 10^5 \cdot 5 \cdot 24 \cdot 150 \cdot 10^6 \exp(-45) \approx 8 \cdot 10^{-5}.$$

Таким образом, за 150 сут работы через термический барьер установки для обработки стоков при принятых в примере условиях может пройти $8 \cdot 10^{-5}$ частиц. Одна БАЧ может попасть во внешние сети канализации примерно за $2 \cdot 10^6$ сут работы.

Однако на современных микробиологических предприятиях вероятность выноса БАЧ со стоками может существенно повышаться при увеличении расходов и особенно обсемененности стоков целевыми микроорганизмами.

Пример II. Оценим количество БАЧ, выносимых со стоками при режиме стерилизации, принятом в примере I, но для условий: расход стоков 100 м³/ч, их обсемененность $1 \cdot 10^8$ клеток в 1 мл.

Решение. $M = 20^8 \cdot 100 \cdot 24 \cdot 150 \cdot 10^6 \exp(-45) = 1{,}6$, т. е. за каждые 150 сут работы во внешние сети канализации могут поступать примерно две БАЧ.

Рассмотренные примеры во многих отношениях условны, поскольку предполагают наличие равномерного температурного поля во всем объеме обрабатываемой жидкости, отсутствие застойных зон, конгломератов частиц и др. На практике дело обстоит значительно сложнее, поэтому особое значение приобретает достоверная оценка действительной безвредности того проскока БАЧ, который наблюдается в реально действующей установке термической обработки стоков.

Необходимым является также сравнение расчетной величины проскока БАЧ при данном режиме с известными на практике значениями аналогичных по смыслу величин, но для других процессов термической обработки, например, стерилизации питательных сред. В разделах 3 и 5 отмечалось, что теоретически при значениях критерия стерилизации более 40 гарантируется абсолютная стерильность среды. В этом случае существует возможность загрязнения лишь одной операции из 1000. Для каких же условий получена эта величина? Обсемененность питательной среды принята равной $1 \cdot 10^6$ спор в 1 мл, вместимость ферментатора 50 м³, питательной

средой загружены 1000 ферментаторов. Оценим значение ∇.

$$\nabla = \ln N_0/N,$$

где $N=0{,}001$; $N_0=1\cdot10^6\cdot10^6\cdot50\cdot0{,}7\cdot1000=3{,}5\cdot10^{17}$, откуда $\nabla=47{,}2$.

Однако на практике абсолютная стерильность достигается при $\nabla\geqslant80$, т. е. сочетание всех особенностей процессов термической стерилизации требует существенного увеличения эффективности обработки. При $\nabla=40$ фактор инактивации равен 17,4, а при $\nabla=80$—34,8. Семнадцать порядков добавляется практикой к так называемому теоретическому режиму стерилизации! Этот факт указывает на необходимость проведения глубоких исследований в той области микробиологической технологии, которая занимается проблемами термической стерилизации различных жидкостей, в том числе и стоков микробиологических лабораторий и производств.

Стоки по своим свойствам, важным для термической обработки, значительно отличаются от питательных сред. Их состав формируется под влиянием различных факторов и может меняться даже в течение суток. Например, при сливе забракованной культуральной жидкости может резко повыситься обсемененность стоков. После обработки помещений растворами деконтаминантов значительно увеличится содержание последних и в сточных водах. В широких пределах изменяется и размер частиц, что непосредственно влияет на эффективность процессов деконтаминации. Не является постоянным и pH стоков. Поэтому на предприятиях микробиологической промышленности должны систематически изучаться и фиксироваться те параметры и показатели, которые характерны для реальных стоков и могут повлиять на увеличение или снижение проскока БАЧ через термические барьеры.

Очистка технологического воздуха. В подавляющем большинстве систем очистки технологического воздуха, удаляемого из аппаратов в качестве основного элемента, задерживающего БАЧ, в настоящее время используются фильтры тонкой очистки. Эффективность работы фильтра характеризуют с помощью коэффициента проскока:

$$K_{\text{п}}^T = \frac{M^T}{M_0^T}\cdot100, \qquad (245)$$

где $K_{\text{п}}^{T}$ — коэффициент проскока, %, M^{T} — количество БАЧ в этом же объеме воздуха после очистки его на фильтрах; M_{0}^{T} — количество БАЧ во всем объеме технологического воздуха, поданного в фильтры.

В соответствии с принципом обеспечения равной эффективности систем и с учетом уравнения (237)

$$\sum_{j=1}^{J} M_{j}^{T} = \sum_{w=1}^{W} M_{w}.$$

При загрязненности воздуха x_{0}^{T} клеток в единице объема и расходе его через фильтр B_{T}:

$$M_{0}^{T} = B_{T} \cdot \tau_{T} \cdot x_{0}^{T}, \tag{246}$$

откуда

$$K_{\text{п}}^{T} = \frac{M^{T} \cdot 100}{B_{T} \tau_{\text{п}} x_{0}^{T}}. \tag{247}$$

Выражение (247) справедливо для коллекторной системы очистки воздуха ($j=1$), поскольку через фильтр или пакет фильтров проходит воздух, удаляемый из всех аппаратов. Что касается индивидуальных и равноценных систем (например, устанавливаемых на группе однотипных ферментаторов), то для каждой из J систем:

$$K_{\text{п}}^{'} = \frac{M_{j}^{T} \cdot 100}{\tau_{\text{п}}^{'} \cdot B_{T}^{'} \cdot x_{0}^{T}}. \tag{248}$$

При расчете суммарного коэффициента проскока для каждой из J неравноценных систем следует учитывать, что

$$\Sigma M_{j}^{T} = M_{1}^{T} + M_{2}^{T} + M_{3}^{T} + \ldots + M_{J}^{T} = \text{const}. \tag{249}$$

На основе соотношения (259) для каждой из систем должны рассчитываться по уравнению (257) значения $K_{\text{п}}$ с учетом расхода воздуха и его обсемененности. Рассмотрим последовательность расчета максимально допустимого значения коэффициента проскока фильтра в коллекторной системе очистки воздуха с учетом требований принципа равной эффективности.

Пример. При производстве энтобактерина на стадии культивирования Bac. thüringiensis воздух, отводимый из ферментаторов вместимостью 100 м^3 каждый, очищается перед удалением в атмосферу в индивидуальных фильтрах тонкой очистки. Требуется опре-

делить максимально допустимый коэффициент проскока этих фильтров при условии: коэффициент заполнения ферментатора 0,8; удельный расход воздуха на аэрацию 0,1 об/(об·мин); концентрация контаминантов в воздухе, поступающем в фильтры, 10^3 клеток в 1 м^3, продолжительность работы цеха ферментации 100 сут, $M \leqslant 8 \cdot 10^{-5}$ (см. пример по стокам).

Решение. 1) Определяем часовой расход воздуха на ферментатор: $B_T = 100 \cdot 0{,}8 \cdot 60 \cdot 0{,}1 = 480$ м^3/ч.

2) Находим максимально допустимое значение коэффициента проскока:

$$K_{\text{п}} = \frac{M' \cdot 100}{B_T \cdot 100 \cdot x_0^T} = \frac{8{,}0 \cdot 10^{-5} \cdot 100}{480 \cdot 100 \cdot 10^3 \cdot 24} \approx 7{,}0 \cdot 10^{-12}.$$

Таким образом, при принятом расходе воздуха и уровне его обсемененности на входе в фильтры необходимо установить группу фильтров, имеющих суммарное значение коэффициента проскока $7 \cdot 10^{-12}$%. В этом случае система очистки технологического воздуха ферментатора будет функционировать с той же эффективностью, что и система термической обработки стоков в ранее рассмотренном примере.

Очистка вентиляционного воздуха. Для расчета требуемой эффективности очистки воздуха, удаляемого с помощью систем вентиляции из лабораторных и производственных помещений во внешнюю среду, целесообразно воспользоваться методическим подходом, уже рассмотренным применительно к системам очистки технологического воздуха. Для фильтров всех вентиляционных систем запишем соотношение

$$K_{\text{п}}^{\text{в}} = \frac{M^{\text{в}}}{M_0^{\text{в}}} \cdot 100, \qquad (250)$$

где $K_{\text{п}}^{\text{в}}$ — суммарный коэффициент проскока всех фильтров вытяжных вентиляционных систем; $M^{\text{в}}$ — количество БАЧ в этом же объеме воздуха после фильтров; $M_0^{\text{в}}$ — количество БАЧ в воздухе, поступающем в фильтры за период времени $\tau_{\text{п}}$.

По аналогии запишем:

$$K_{\text{п}}^{\text{в}} = \frac{M^{\text{в}} \cdot 100}{B_{\text{в}} \cdot \tau_{\text{п}} \cdot x_0^{\text{в}}}, \qquad (251)$$

где $B_{\text{в}}$ — производительность всех вытяжных вентиляционных систем; $x_0^{\text{в}}$ — концентрация БАЧ в воздухе, поступающем в фильтры вытяжных вентиляционных установок.

Замечания, сделанные для равноценных и неравноценных технологических систем очистки воздуха, справедливы и в этом случае. Аналогично проводят и расче-

ты по определению необходимых значений $K_п$ каждой вентиляционной системы.

Обработка предметов. Обработка предметов (оборудования, приборов, инструментов), передаваемых из загрязненных помещений в чистые, осуществляется на современных микробиологических предприятиях в различных технических устройствах (см. раздел 12.4). При этом используемые для деконтаминации процессы выбирают в зависимости от характеристик обрабатываемых предметов (устойчивость к воздействию данного летального фактора при обеспечении требуемой эффективности деконтаминации). С учетом принимаемого метода обработки (химический, радиационный, тепловой и др.) нужно выбирать и соответствующие уравнения (см. раздел 3) для оценки количества оставшихся жизнеспособных микроорганизмов N к моменту времени τ, а затем — и для расчета показателя асептической эффективности или вероятности проскока БАЧ через данный барьер (передаточный автоклав, ванна, шлюз и др.).

И в этом случае необходимо знание констант устойчивости БАЧ под действием каждого из летальных факторов. Количественные методы оценки эффективности обработки различных предметов позволят выявить «слабые» процессы и технические устройства и принять обоснованные решения по их доработке.

Заключение

Итак, мы обсудили наиболее принципиальные теоретические и прикладные вопросы, связанные с проблемой гарантированного получения чистых микробиологических препаратов. При этом рассмотрены два взаимосвязанных направления: защита полупродуктов и продуктов микробиологических лабораторий и производств от посторонней микрофлоры (внутренняя задача), защита персонала и окружающей среды от биологически активных частиц (внешняя задача). Исключительное многообразие, разнохарактерность и сложность процессов, осуществляемых при задержке и (или) инактивации контаминантов, зависимость конечного результата от многих факторов, часто не поддающихся строгому количественному учету, позволили нам обосновать необхо-

димость вероятностного подхода к решению и внутренней и внешней задач. Использование методов теории вероятностей в сочетании с экспериментальными данными по технологии и производственной санитарии микробиологических производств дает возможность применять количественные оценки эффективности процессов, выявлять наиболее «слабые» из них, решать задачи по сравнительной оценке эффективности комплекса разнородных процессов. Мы рассмотрели принципиальные подходы к решению наиболее актуальных вопросов, характерных для всех стадий получения микробиологических препаратов.

Следует подчеркнуть существенно отличающийся уровень решения внутренней и внешней задачи, достигнутый как в теоретическом, так и в прикладном направлениях. Внутренняя задача решена более полно, хотя еще имеются вопросы, теория и практика которых разработана в недостаточной степени. В их числе герметизация сложных технологических систем, работающих в асептических условиях, создание и поддержание этих условий в течение длительного времени в различных системах микробиологических лабораторий и производств. Указанные вопросы включают как глубокое теоретическое и экспериментальное изучение самих процессов, так и разработку новых элементов, узлов и аппаратов, в полной мере отвечающих требованиям микробиологических производств. Требуют дальнейшего решения вопросы оптимальных режимов стерилизации различных жидкостей, в том числе питательных сред, пеногасителей, растворов сахаров и др. При этом следует еще раз отметить исключительную важность экспериментального определения кинетических констант процессов инактивации посторонней микрофлоры и разложения веществ под действием стерилизующих факторов (температура, pH и т. д.).

Значительно меньше информации накоплено в области решения внешней задачи. Еще недостаточно полно охарактеризованы материальные потоки — потенциальные источники биологически активных частиц. Не обоснованы требования к необходимой эффективности обработки потоков, а как следствие — еще не созданы инженерные системы профсанитарии, которые бы в полном объеме решали задачу по гарантированному (с задан-

ной вероятностью) предупреждению выноса продуктов микробиологических производств в окружающую среду.

Таким образом, рассмотренные в книге проблемы требуют дальнейшего углубления и развития в теоретическом и прикладном направлениях с участием специалистов, работающих в области микробиологической технологии, микробиологии, физической химии, математики, машиностроения и др. Решение этих проблем позволит поднять на новый уровень не только качество микробиологических препаратов, их чистоту и стандартность, но и степень защищенности окружающей среды от потенциальных вредностей самых различных микробиологических производств. При этом наиболее плодотворным, на наш взгляд, является комплексный подход к решению внутренней и внешней задач, базирующийся на количественной (в том числе и сравнительной) оценке эффективности каждого из процессов, влияющих на чистоту микробиологических препаратов.

Теоретические и экспериментальные исследования должны базироваться на глубоко обоснованных методических подходах, предполагающих анализ всех реально существующих материальных потоков, являющихся потенциальными источниками поступления БАЧ как в аппараты и коммуникации, так и в окружающую среду. Следует обратить особое внимание на всестороннее изучение свойств этих потоков, в том числе физико-химических и биологических характеристик, позволяющих грамотно сформулировать требования к процессам и режимам, использование которых позволит гарантированно задержать или инактивировать БАЧ. Очевидно, что свойства реальных материальных потоков, характерных для лабораторных и производственных корпусов микробиологических предприятий, в наиболее полном объеме могут быть изучены именно в условиях этих предприятий. Однако при этом возникают трудности как методического, так и организационного характера. Успех их преодоления во многом зависит от объема и качества информации, полученной на первых этапах разработок, т. е. в условиях лабораторий и на пилотных установках.

Именно на лабораторном уровне должен быть проведен значительный объем исследований, направленных, в первую очередь, на обоснование методик и коли-

чественную характеристику свойств материальных потоков и их изменения под влиянием факторов, характерных для технических систем микробиологических производств.

Например, если речь идет об обосновании оптимальных режимов термической стерилизации пеногасителей, то наряду с кинетикой отмирания посторонней микрофлоры должна быть изучена кинетика измерения пеногасящих свойств, в некоторых случаях и появления продуктов разложения — ингибиторов ферментации.

При решении задачи по обработке стоков должна быть изучена кинетика отмирания микроорганизмов, являющихся целевыми для данного производства. В обоих рассмотренных случаях основу оптимизации технологических процессов и конкретных режимов составляет знание кинетических характеристик процессов инактивации конкретных микроорганизмов. Их изучение в условиях лабораторий должно стать неотъемлемой частью исследований при создании лабораторных регламентов практически всех микробиологических препаратов. При этом основные условия изучения кинетики инактивации должны приниматься по данным обследования реальных микробиологических производств. В первую очередь это относится к диапазону температур, возможное варьирование которых зависит и от конкретных технических характеристик систем пароснабжения и от применяемого способа инактивации (периодический или непрерывный). Важно учесть и диапазон изменения pH, так как устойчивость микроорганизмов к температуре существенно зависит от этого показателя. Следует оценить и существующие на предприятии временные характеристики процессов инактивации и изучать влияние температурно-временных параметров на кинетику инактивации.

Общность методических подходов в решении внутренней и внешней задачи асептики может быть проиллюстрирована и на примерах обеспечения требуемой эффективности герметизации отдельных аппаратов и сложных технических систем, а также очистки воздуха либо поступающего в процесс (например, на аэрацию культуральной жидкости), либо удаляемого из аппаратов во внешнюю среду (например, из распылительных сушилок).

Если при обеспечении герметизации необходимо знать допускаемую утечку воздуха через возможные неплотности в оборудовании и коммуникациях, то в случае очистки воздуха требуется знание допустимого суммарного коэффициента проскока всех технических устройств, стоящих на пути от воздушного компрессора до ферментатора, а также на пути от распылительной сушилки до точки выброса воздушного потока в атмосферу. Важно подчеркнуть, что в том и в другом случае речь идет о количественной характеристике требуемой эффективности реализуемого процесса (герметизации оборудования или очистки воздуха).

В лабораторных условиях должны быть обоснованы и количественно охарактеризованы также и методы экспериментального определения эффективности того или иного процесса. Например, при изучении эффективности очистки воздуха в вентиляционных системах микробиологических производств исключительную роль играет чувствительность применяемых методов контроля обсемененности воздуха. Если предполагается использование методов с отбором и последующим анализом проб из материальной линии, то особое значение приобретает соотношение между общим объемом воздуха, проходящим через фильтры вентиляционных камер, и объемом воздуха, отбираемым в качестве пробы. Аналогичная задача возникает и при характеристике эффективности режимов стерилизации питательных сред и стоков, особенно в установках непрерывной стерилизации, когда исследователи полагают необходимым дать заключение о микробиологической чистоте достаточно большого объема жидкости по результатам исследования отбираемой пробы.

Отмечая общность и внутреннюю взаимосвязь методических подходов к решению внутренней и внешней задачи асептики, необходимо подчеркнуть, что все они должны базироваться на строгой количественной оценке как требуемой эффективности задержки и инактивации БАЧ, так и на эффективности реализуемых при этом процессов. Это требование предполагает необходимость проведения широких и всесторонних теоретических и экспериментальных исследований с целью наиболее полного решения задач асептики микробиологических производств.

Список литературы

1. *Александров В. Я.* Клетки, макромолекулы и температура. — Л.: Наука, 1975. — 330 с.

2. *Алферова В. Б., Богачева Р. И.* Режим стерилизации жидкой питательной среды в глубинном производстве кишечных вакцин. — В кн.: Труды Ташкентского НИИ вакцин и сывороток. — Ташкент, 1961, т. VI(20), с. 65—69.

3. *Алферова В. Б., Мокеева А. Д., Самойлова О. Е.* Закрытый способ изготовления казеинново-угольного агара. — В кн.: Труды Ташкентского НИИ вакцин и сывороток. Ташкент, 1961, с. 53.

4. *Алферова В. Б., Мокеева А. Д., Богачева Р. И.* и др. Реакторный способ стерилизации физиологического раствора. Ташкент, с. 57—59.

5. *Анисифорова В. Н., Падалкин В. П.* Деконтаминация воздуха и поверхностей рабочих помещений производств, основанных на микробиологическом синтезе. Главмикробиопром, ОНТИТЭИ, — М, 1977, — 88 с.

6. *Безбородов А. М.* Технологические и биохимические основы регулирования обмена веществ микроорганизмов при направленном биосинтезе. — В кн.: Инженерные проблемы микробиологического синтеза. М., 1969, с. 181—183.

7. *Борисова Т. Г., Гоферман Ч. Я.* Основы технологии антибиотиков и витамина B_{12}. — М.: Высшая школа, 1967. — 167 с.

8. *Буренин В. В.* Современные тенденции развития конструкций уплотнений для неподвижных соединений. Обзор патентов (Англия, Франция, США). — М.: Химическое и нефтяное машиностроение, 1974, № 7, с. 45—47.

9. *Былинкина Е. С.* Основные вопросы биотехнологии. — В кн.: Инженерные проблемы микробиологического синтеза. — М., 1969, с. 5—11.

10. *Былинкина Е. С., Обыденова Л. А.* Стерилизация воздуха, аппаратов и сред, подготовка аппаратов к загрузке. — В кн.: Производство антибиотиков. М., Медицина, 1970, с. 80—92.

11. *Васильев Н. Н., Амбросов В. А., Складнев А. А.* Моделирование процессов микробиологического синтеза. — М.: Лесная промышленность, 1975. — 342 с.

12. *Вентцель Е. С.* Теория вероятностей. — М.: Физматгиз, 1962. — 576 с.

13. *Волошин А. А., Григорьев Г. Т.* Расчет и конструирование фланцевых соединений. — В кн.: Справочник «Машиностроение». Л., 1972. — 136 с.

14. *Гельперин Н. Н., Лазебник А. Н., Манусов Е. Б.* и др. Расчет теплообмена в периодических реакторах с мешалками. — Лакокрасочные материалы и их применение, 1967, № 2, с. 74—78.

15. *Гнеденко Б. В.* Курс теории вероятностей. Изд. 5-е. — М.: Наука, 1969. — 400 с.

16. *Гуляев С. П., Руденко Т. П., Кодина Г. В.* и др. О некоторых особенностях условий труда на предприятиях, основанных на микробиологическом синтезе. — В кн.: Труды ВНИИ продуктов брожения, 1970, № 19, с. 271—280.

17. *Гуревич Д. Ф.* Расчет и конструирование трубопроводной арматуры. — М.: Машгиз, 1969. — 887 с.

18. *Гуревич Д. Ф.* Трубопроводная арматура. — Л.; Машиностроение, 1975. — 311 с.

19. *Дудина Л. П., Евдокимов В. Л., Матвеев В. Е.* и др. Оценка задерживающей эффективности фильтров в технологии микробиологических производств. — Микробиологическая промышленность, 1970, № 4, с. 35—38.

20. *Дулевичус И. И., Молдаванов О. И.* Влияние точности сборки фланцевых соединений на их герметичность. — Строительство трубопроводов, 1969, № 5, с. 22—24.

21. *Дулевичус И. И., Молдаванов О. И.* Расчет герметичности фланцевых соединений в условиях динамического режима нагружения. — Строительство трубопроводов, 1970, № 9, с. 21—23.

22. *Забродский А. Г., Осовик А. Н., Гридина Л. Е.* и др. Предупреждение гибели дрожжей при выращивании их на мелассной барде. — Ферментная и спиртовая промышленность, 1978, № 8, с. 14—16.

23. *Иванов С. З.* Распад сахарозы и пути ее снижения в сахарном производстве. Дисс. докт. — М., 1958.

24. *Израйлет Л. И., Феоктистова Р. П.* Обоснование санитарно-защитных зон от некоторых ферментных предприятий. — Гигиена и санитария, 1970, № 6, с. 80—81.

25. *Ильина Л. Д., Евницкая Г. С., Лишко П. Б.* Инфицирующая микрофлора в производстве кормовых дрожжей. — Ферментная и спиртовая промышленность, 1972, № 1, с. 21—23.

26. *Ицыгин С. Б., Бирюков В. В., Лурье Л. М.* и др. Изучение влияния микроконцентраций глюкозы на биосинтез пенициллина. — Антибиотики, 1977, № 7, с. 581—587.

27. *Калунянц К. А.* Перспективы развития производства ферментных препаратов. — Ферментная и спиртовая промышленность, 1978, № 2, с. 10—12.

28. *Карабин А. Н.* Сжатый воздух. — М.; Машиностроение, 1964. — 343 с.

29. *Киктенко В. С.* Санитарная микробиология воздуха. — В кн.: Санитарная микробиология. М., Медицина, 1969, с. 256—267.

30. *Киселев П. Н.* Основы уплотнений в арматуре высокого давления. — М.: Госэнергоиздат, 1950. — 155 с.

31. *Кокурин В. А., Егоров А. И.* Теоретические основы процесса термического обеззараживания сточных вод. — Труды института ВОДГЕО, 1975, вып. 51, с. 3—9.

32. *Колчева Р. А., Сапронов А. Р.* Методика вычисления количества разложившегося сахара. — Сахарная промышленность, 1971, № 8, с. 12—14.

33. *Корниенкова В. И., Гошко А. И., Карпук И. И.* Исследование герметичности фторопластовых уплотнений с использованием методов планирования эксперимента. Экспресс-информация ЦИНТИхимнефтемаш, серия ХМ-10, 1974, № 9, 16 с.

34. *Корш Л. Е.* Сапрофитная микрофлора воды. — В кн.: Санитарная микробиология. М., Медицина, 1969, с. 179—182.

35. *Кук Г. А.* Пастеризация молока. — М.: Пищепромиздат, 1951. — 240 с.

36. *Левитов М. М., Бринберг С. Л.* Основы ферментации. — В кн.: Производство антибиотиков. М., Медицина, 1970, с 32—45.

37. *Логинова Л. Г.* Физиологические особенности термофильных микроорганизмов. — Успехи микробиологии, 1971, № 7, с. 108—119.

38. *Мамонтов Г. В., Вашин Г. З.* Прокладки для фланцевых соединений арматуры, трубопроводов и оборудования нефтяной, химической и газовой промышленности. Экспресс-информация ЦИНТИхимнефтемаш, серия ХМ-10, 1972. — 29 с.

39. *Мамонтов Г. В.* Об испытании арматуры водой, керосином и воздухом. — Химическое и нефтяное машиностроение, 1969, № 2, с. 32—33.

40. *Матвеев В. Е., Скворцов Г. Е.* Методы ускоренного расчета эффективности режимов тепловой обработки питательных сред в микробиологической промышленности. — Микробиологическая промышленность, 1970, № 2, с. 17—20.

41. *Матвеев В. Е., Скворцов Г. Е.* Оценка асептической эффективности технологических процессов в микробиологической промышленности. — Микробиологическая промышленность, 1970, № 4, с. 31—34.

42. *Матвеев В. Е., Скворцов Г. Е., Щеблыкин Н. П.* Расчетные и экспериментальные методы оценки эффективности процессов термической стерилизации. Главмикробиопром, ОНТИТЭИ. — М., 1975. — 64 с.

43. *Матвеев В. Е., Скворцов Г. Е., Эйромджанц А. В.* Некоторые особенности коммуницирования трубопроводов, работающих в асептических условиях. — Микробиологическая промышленность, 1975, № 7, с. 1—4.

44. *Матвеев В. Е., Скворцов Г. Е.* О вероятностном методе оценки количества жизнеспособных микроорганизмов в жидкости, подвергаемой тепловой обработке. — Микробиологическая промышленность, 1975, № 11, с. 7—10.

45. *Матвеев В. Е., Скворцов Г. Е.* Статистическая оценка задерживающей эффективности фильтров тонкой очистки воздуха в технологии микробиологических производств. — Микробиологическая промышленность, 1975, № 11 (131), с. 7—10.

46. *Матвеев В. Е., Скворцов Г. Е., Зарубин А. П.* и др. Экспериментальная оценка стерилизуемости некоторых узлов монтажных схем ферментеров и магистральных трубопроводов. — Микробиологическая промышленность, 1976, № 2, с. 12—15.

47. *Матвеев В. Е., Смирнов Е. В.* Термическая стерилизация растворов сахаров. ОНТИТЭИ, Главмикробиопром, 1976, — 63 с.

48. *Матвеев В. Е., Тарасенко В. И.* О вероятностно-статистической оценке эффективности герметизации технических систем, работающих в асептических условиях. — Микробиологическая промышленность, 1977, № 2, с. 9—12.

49. *Матвеев В. Е., Зотов Ю. Д., Матвеева И. М.* Количественные характеристики эффективности герметизации оборудования и коммуникаций, работающих в асептических условиях. — Микробиологическая промышленность, 1977, № 2, с. 12—16.

50. *Матвеев В. Е., Тарасенко В. М., Воробьев А. А.* Принципы оптимизации и масштабирования некоторых процессов в технологии вакцинных производств. Сообщение I. Некоторые вопросы масштабирования и оптимизации при термической стерилизации жидкостей. — Журн. микробиол., 1977, № 10, с. 33—37.

51. *Матвеев В. Е., Тарасенко В. М., Воробьев А. А.* Принципы оптимизации и масштабирования некоторых процессов в технологии вакцинных производств. Сообщение II. Моделирование процессов термической инактивации микроорганизмов. — Журн. микробиол., 1977, № 12, с. 77—83.

52. *Матвеев В. Е., Тарасенко В. М., Воробьев А. А.* и др. Принципы оптимизации и масштабирования некоторых процессов в технологии вакцинных производств. Сообщение III. Методика определения оптимального режима термической стерилизации сахаров. — Журн. микробиол., 1978, № 1, с. 118—123.

53. *Матвеев В. Е., Скворцов Г. Е., Эйромджанц А. В.* Коллекторное устройство монтажных схем аппаратов микробиологических производств. — Антибиотики, 1979, № 10, с. 742—745.

54. *Матвеев В. Е., Скворцов Г. Е., Эйромджанц А. В.* и др. Пробоотборник для герметичного отбора проб жидкости из емкостей, работающих в асептических условиях. (II) 597938 (21) 2118666/23—26 (22) 01.04.75 2 (51) 01 1/10 (53) 543.053 (72).

55. *Матвеев В. Е., Скворцов Г. Е., Эйромджанц А. В.* Оптимизация режима стерилизации посуды и питательных сред методом автоклавирования. — Антибиотики. 1980, № 1, с. 20—24.

56. *Матвеев В. Е., Скворцов Г. Е., Эйромджанц А. В.* и др. Устройство для отбора проб и введения добавок в асептических условиях. — Антибиотики, 1980, № 2, с. 92—96.

57. *Матвеев В. Е., Вадимов В. М., Воробьев А. А.* Научные основы получения чистых культур микроорганизмов в технологии вакцин. — М.; Медицина, 1980. — 255 с.

58. *Михатова Г. Н., Попова Э. К.* О влиянии микрофлоры на pH и вязкость рафинадных сиропов. — Сахарная промышленность, 1971, № 4, с. 17—20.

59. *Молдаванов О. И., Камерштейн А. Г., Снепер А. К.* Расчет надежности фланцевого соединения по известным параметрам качества. — Химическое и нефтяное машиностроение, 1973, № 4, с. 35—38.

60. *Мотина Г. Л.* Стерилизация технологического воздуха в процессе ферментации. — В кн.: Инженерные проблемы микробиологического синтеза. М., 1969, с. 71—76.

61. *Мотина Г. Л., Батова Л. К., Гандман М. Г.* и др. Метод определения эффективности фильтров для стерилизации технологического воздуха в производственных условиях с помощью аэрозоля красителя метиленового синего. — Хим.-фарм. журн., 1974, № 10, с. 55—59.

62. *Остапенков А. М., Матисон В. А.* Стерилизация мелассы

в сверхвысокочастотных электромагнитных полях. — Известия вузов. Пищевая технология. 1975, № 6, с. 77—79.

63. Отраслевой стандарт. Промышленный регламент производства химико-фармацевтического препарата. Содержание. Порядок разработки, утверждения и изменения. ОСТ 64-2-72. Мин. мед. пром. СССР. — М., 1973.

64. *Пасынский А. Г.* Биофизическая химия. — М.; Высшая школа, 1968. — 432 с.

65. *Петряков Н. В., Козлов В. И., Басманов П. Н.* и др. Волокнистые фильтрующие материалы. — М.: Знание, 1968. — 78 с.

66. *Питерских Г. П.* Основные уравнения тепловой обработки аппаратуры фармацевтических производств. — Медицинская промышленность СССР, 1966, № 12, с. 32—37.

67. *Попова Э. К., Петретите Г. М.* Микрофлора рафинадных продуктов. — Сахарная промышленность, 1967, № 7, с. 32—33.

68. *Производство* антибиотиков. — М.; Медицина, 1970. — 367 с.

69. *Продан В. Д., Морозов Ю. М., Сейджанов К.* Условия герметизации упругими уплотняющими поверхностями прочноплотных соединений. Экспресс-информация ЦИНТИхимнефтемаш, серия ХМ-10, 1975, 1, 19 с.

70. *Пронченко И. П., Степанченко Ю. П., Шляфман Е. М.* Характеристика фланцевого соединения с прокладкой из фторопласта-4. — Вестник машиностроения, 1972, № 2, с. 22—26.

71. *Протопопов В. Б.* Уплотнения судовых фланцевых соединений. — М.; Судостроение, 1966. — 160 с.

72. *Рогачев В. И.* Исследования по технологии консервирования пищевых продуктов. Доклад по опубликованным работам, представляемым на соискание ученой степени доктора технических наук. — М., 1968, с. 27—36.

73. *Рогачев В. И. Мазохина Н. Н., Розанова Л. И.* и др. Вода как источник инфицирования спорами анаэробных микроорганизмов. — Консервная и овощесушильная промышленность, 1968, № 7, с. 24—26.

74. *Сапронов А. Р.* Кинетика разложения мальтозы и арабинозы. — Ферментная и спиртовая промышленность, 1969, № 4, с. 25—28.

75. *Сапронов А. Р., Харин С. Е.* Влияние pH и температуры на устойчивость сахарозы в растворах. — Сахарная промышленность, 1969, № 6, с. 10—15.

76. *Скворцов Г. Е., Матвеев В. Е.* Подготовка стерильного сжатого воздуха в микробиологических производствах. — В кн.: Микробиология — народному хозяйству. Новосибирск, Наука, 1974, с. 107—113.

77. *Скворцов Г. Е., Эйромджанц А. В., Хмелек В. Н.* Контроль герметичности сильфонов узлов герметизации оборудования, используемого в технологии микробиологических производств. — Антибиотики, 1979, № 1, с. 21—24.

78. *Смирнов В. А., Бондаренко А. Н.* Карамелизация глюкозы. — В кн.: Труды Ленинградского технологического института, 1951, т. 2(X), с. 135—144.

79. *Солдатенков В. И., Хрущ В. Т.* К методике оценки эффективности санитарно-пропускного режима. — Гигиена и санитария, 1971, № 6, с. 67—71.

80. *Тарасенко В. М., Джарылгасов С. А., Падалкин В. П.* Деконтаминация промышленных стоков и спецодежда персонала микробиологических производств. Главмикробиопром, ОНТИТЭИ. — М., 1975. — 66 с.

81. *Тарасьев Ю. Н., Кабельский М. И., Прохоренко Е. Д.* и др. Исследование зависимости ресурса многослойных сильфонов от хода на сжатие. — Химическое и нефтяное машиностроение, 1969, № 6, с. 32—33.

82. *Тарасьев Ю. Н., Кабельский М. И., Прохоренко Е. Д.* и др. Многослойные сильфоны для арматуры больших размеров. — Химическое и нефтяное машиностроение, 1969, № 10, с. 3—4.

83. *Ткач Л. Н., Домашнев А. Д.* О механизме герметизации и оценке плотности подвижных контактных уплотнений. — Химическое и нефтяное машиностроение, 1968, № 11, с. 6—8.

84. *Федоров Н. Е.* Расчеты и анализ теплообмена при стерилизации мясных консервов. ЦНИИТЭИ, Мин. мясн. и молочн. пром. РСФСР — М., 1968. — 48 с.

85. *Федосеев К. Г.* Процессы и аппараты биотехнологии в химико-фармацевтической промышленности. — М.; Медицина, 1969. — 199 с.

86. *Флауменбаум Б. Л., Мордвинова С. А., Раевская М. В.* Расчет режимов стерилизации «Томатов протертых» в зависимости от термоустойчивости спор. Bac. Coagulans. — Консервная и овощесушильная промышленность, 1973, № 2, с. 20—22.

87. *Фукс Н. А.* Механика аэрозолей, М., Изд. Академии наук СССР, 1955. — 351 с.

88. *Харин С. Е., Колчева Р. А., Сапронов А. Р.* Кинетика разложения некоторых аминокислот в зависимости от pH. — Ферментная и спиртовая промышленность, 1970, № 2, с. 21—23.

89. *Шишкин А. А.* Исследование влияния технологических факторов на качество запорной трубопроводной арматуры. — Химическое и нефтяное машиностроение, 1972, № 8, с. 31—34.

90. *Шляпошников Б. М., Соколов В. Ф.* Оценка непроницаемости сварных замкнутых конструкций при воздушных испытаниях. — Сварочное производство, 1967, № 10, с. 36—38.

91. *Шеблыкин Н. П.* Исследование и разработка методов повышения эффективности работы ферментерных цехов ацетонобутиловых заводов. Дисс. канд. — М., 1969.

92. *Шупляк И. А., Таганов Н. И.* К расчету плотности фланцевых соединений с прокладками из полимерных материалов. — Вестник машиностроения, 1966, № 1, с. 32—34.

93. *Яровенко В. Л.* Исследование и разработка методов непрерывного спиртового и ацетонобутилового брожения. — М.: Пищевая промышленность, 1975. — 103 с.

94. *Ярышев Н. А.* Теоретические основы измерения нестационарных температур. — Л.: Энергия, 1967. — 299 с.

95. *Adam W.* Vergleichende Untersuchungen über die Dampf—Sterilization mit Vorvakuum. — Archiv für Hygiene und Bacteriologie. 1964, Bd. 148, № 4/5, S. 310—320.

96. *Aiba S., Humphrey A., Millis N.* Biochemical Engineering. New York, Academic Press, 1965, 287 p.

97. *Ball C. O., Olson F. C. W.* Sterilization in food technology.— McGraw Hill, New York, 1957, 654 p.

98. *Biochemical* and biological engineering science. V. 1. Ed. by N. Blakebrough. Academic Press. 1967.
99. *Brannen J. P.* On the role of DNA in wet heat sterilization of microorganisms. — J. Theor. Biol. 1970, v. 27, p. 425—432.
100. *Brannen J. P.* A rational model for thermal sterilization of microorganisms. — Mathemat. Biosciences, 1968, v. 2, № 1/2, p. 165—179.
101. *Bruhin H., Bühmann X., Vigcher W.* Möglichkeiten und Grenzen der Äthylenoxid—Sterilisation. — Zbl. f. Bakt., Parasit., Iniekt. u. Hyg., 1968, Bd. 208, № 4, S. 563—567.
102. *Chatigny M. A.* Microbiological laboratory safety advances in applied microbiology — New York, Academic Press, 1961.
103. *Coming* clean through environment control. — Manufact. Chem. Aerosol News, 1977, v. 48, № 8, p. 19—39.
104. *Cooper R. D., Kao E. I.* A method for prediction of the effect of sterilization on the pH of culture media. — J. Ferment. Technol., 1977, v. 55, № 2, p. 204—206.
105. *Das A.* Laminar flow and clean rooms. — Manufact. Chemist. Aerosol News., 1970, v. 41, № 1, p. 27—33.
106. *Deindoerfer F. H.* Calculation of heat sterilization times for fermentation media. — Appl. Microbiol., 1957, v. 5, № 4, p. 221—228.
107. *Deindoerfer F. H., Humphrey A. E.* Analytical method for calculating heat sterilization times. — Appl. Microbiol., 1959, v. 7, № 4, p. 256—264.
108. *Deindoerfer F. H., Humphrey A. E.* Principles in the design of continuous sterilizers. — Appl. Microbiol., 1959, v. 7, № 4, p. 264—269.
109. *Devies O. L., Eishburn A. G.* Sampling sterility tests. — Pharm. J. 1948, v. 160, p. 184—185.
110. *Dyment J., Edwards J.* The on-site testing of air filter installations — Filtrat. Separat., 1976, v. 13, № 4, p. 379—385.
111. *Dyment J.* Clean rooms and standardisation. — Filtrat. Separat., 1973, v. 10, № 5, p. 591—592.
112. *Eisenberg F. G.* Improved hooded sampling system for laboratory and bench scale fermentors. — Biotechnol. Bioeng., 1978, v. 20, № 5, p. 767—768.
113. *Fredrickson A. G.* Stochastic models for sterilization. — Biotechnol. Bioeng. 1966, v. 8, № 1, p. 167—182.
114. *Gay M., Gallin R.* Rein-Raum-Technik in Pharma-Betrieben; Erfahrungen und Kritische Betrachtungen, speziell aus mikrobiologischer Sicht. — Pharm. Industrie. 1970, Bd. 32, № 12, S. 1099—1104.
115. *Grady C. P. L., Harlow L. J., Riesing R. R.* Effects of growth rate and influent substrate concentration on effluent quality from chemostats containing bacteria in pure and mixed culture. — Biotechn. Bioengin., 1972, v. 14, № 3, p. 391—410.
116. *Hahn G. J., Shapiro S. S.* Statistical Models in Engineering. John Wiley and Sons, Inc. New York, London, Sydney, 1967, 395 p.
117. *Hansen B. L.* Quality control. Theory and applications. Prentice—Hall, Inc., Englewood Cliffs, New York, 1966, 519 p.
118. *Harstad J. B., Filler M. E.* Evaluation of air filters with submicron viral aerosols and bacterial aerosols. — Amer. Ind. Hyg. Assoc. J., 1969, v. 30, № 3, p. 280—290.
119. *Hemert P.* Vaccine production as a unit process. — Rijks Instituut Voor de Volksgezondheid. — Utrecht, 1971.

121. *Herrman J.* Qualitäts und Proze: optimierung zur Erhöhung mistry and industry, 1968, v. 38, № 21, p. 1260—1265.

121. *Herrman J.* Qualitäts und Proze: optimierung zur Erhöhung der Effektivität der Lebensmittelprodukten durch die Reaktionskine der Lebensmittel. — Lebensmittel-ind., 1976, Bd. 23, № 9, S. 399—401.

122. *Humphrey A. E., Deindoerfer F. H.* Optimal disign of fibrous filters for air sterilization. — Folia microbiologica, 1961, v. 6, № 1, p. 1—9.

123. *Humphrey A.* Lecture on the biochemical engineering. Medium sterilization. — J. Fermentation Technology, 1964, v. 42, № 6, p. 393—403.

124. *Humphrey A. E.* Air sterilization. — Adv. Appl. Microb. 1960, v. 2, p. 301.

125. *Jones R. C., Anthony R. M.* The relationship between nutrient feed rate and specific growth rate in fed batch cultures. — European. J. Appl. Microbiol., 1977, v. 4, № 2, p. 87—92.

126. *Khan A. A., Tallentire A.* Quality assurance of sterilized products: verification of a model relating frequensy of contaminated items and in creasing radiation dose. — J. Appl. Bacteriol., 1977, v. 43, № 2, p. 205—213.

127. *Komemushi S.* Problems of heat sterilization Kinetics. — J. Ferment. Technology (Japan), 1971, v. 49, № 8, p. 706—715.

128. *Knudsen L. F.* Sample size of parenteral solutions for sterility testing. — J. Amer. pharm. Ass. Sci. Eng. 1949, v. 38, p. 332—337.

129. *Lin S. H.* A theoretical analysis of thermal sterilization in a continuous sterilizer. — J. Ferment. Technol., 1975, v. 53, № 2, p. 92—98.

130. *Lin S. H.* Continuous high-temperature short-time sterilization of liquid foods with steam-injection heating. — Chem. Eng. Science, 1976, v. 31, № 1, p. 77—82.

131. *Lundell R., Laiho P.* Engineering of fermentation plants. 1. Design aspects. — Proc. Biochem., 1976, v. 11, № 3, p. 13—17.

132. *Malligo John E.* Use of an organoleptic tracer (mercaptan) for testing for leaks of safety equipment. — Appl. and Environ. Microbiol. 1977, v. 34, № 6, p. 861—862.

133. *Manson J. E., Cullen J. E.* Thermal process simulation for aseptic processing of foods containing discrete particulate matter.— J. Food Science, 1974, v. 39, № 6, p. 1084—1089.

134. *Meynell G., Meynell E.* Theory and Practice in Experimental Bacteriology. Cambridge. At the University Press, 1965, 347 p.

135. *Müller F., Herrman G.* Zersetzung thermolabiler Substanzen in Durchlaufverdampfen, — Pharmaz. Industrie, 1970, 32, Bd. 10, S. 842—845.

136. *Mütter K., Kieslich K.* Technologie der Derstellung organischer Substanzen mit Microorganismen. — Chemie Ingenieur Technik, 1966, Bd. 38, № 8, S. 813—825.

137. *Nowakowska-Waszczuk Anna, Krystyna Olczyk.* Przydathosc niektorych antibiotykow i dwuglukonianu chloroheksydeny do ochrony czystosci mikrobiologicznej fermentacji cytrynowej. — Przem. ferm i rol., 1978, 22, № 2, p. 30—34.

138. *Ochs H. J.* Electro-Lüftfilter zur Luftfeinreinigung. — Wasser, Luft und Betrieb, 1971, Bd. 15, № 6, S. 220—223.

139. *Oquendo R., Valdivieso L., Stahl R. et al.* Versuchsanlage zur thermischen inaktivierung von Mikroorganismen bei Temperaturen

über 120° C und vernachlässigbarer Aufheiz—und Abkühlphase. — Lebensm.-Wiss. u. — Technol., 1975, Bd. 8, № 4, S. 181—182.

140. *Overman J. R.* New directions in the production of vaccines. — Biotechnol. Bioeng, 1968, v. 10, № 5, p. 669—675.

141. *Pfeifer V. F., Vojnovich C.* Continuous sterilization of media in biochemical processes. — Ind. Eng. Chem., 1952, v. 44, № 8, p. 1940—1946.

142. *Pirt S. J.* Principles of Microbe and Cell Cultivation. Blackwell Scientific Publications. Oxford, London, Edinburgh, Melbourne, 1975, 331 p.

143. *Ramming Gabriele, Linke H., Leistner L.* Einfluß verschiedener Techniken der Durchmischung der Verdünnungs flüssigkeit auf die Ausbeute und Streuung der Keimzahlbestimmung. — Fleischwirtschaft, 1971, 51, Bd. 11, S. 1652—1653.

144. *Rehm H.* Moderne microbiologisch—technische Fermentationen und ihre Auswirkungen auf verfahrenstechnische Entwicklungen.— Chemie-Ing.-Techn., 1970, Bd. 42, 9/10, S. 580—589.

145. *Richards T.* Rapid Calculations for heat sterilizations. — Brit. Chem. Engng., 1965, v. 10, № 3, p. 166—169.

146. *Rose A. H.* Chemical Microbiology. Bath University of Technology, Bath Second Edition. London Butterworths, 1968, 294 p.

147. *Russel J. H.* High, volume air sterilization. — Proc. Biochem., 1971, v. 6, № 9, p. 25—28.

148. *Schlegel H. G.* Allgemeine Microbiologie. 2., überarbeitete und erweiterte Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1972, 476 S.

149. *Toda K.* Some problems of heat sterilization. — J. Chem. Soc., Jap., 1969, v. 72, № 2, p. 402—408.

150. *Toda K.* Studies on heat sterilization. Complex reaction model for heat inactivation of bacterial spores. — J. Ferment. Technol. 1970, v. 48, p. 811—818.

151. *Shull J. J., Cargo G. T., Ernst R. R.* Kinetics of heat activation and of thermal death of bacterial spores. — Appl. Microbiol. 1963, v. 11, № 6, p. 485—487.

152. *Sittig W., Heine H.* Forderungen von Betrieb und Praxis an die Ausrüstung biotechnologischer Anlagen. — Verfahrenstechnik, 1977, Bd. 11, № 7, S. 400—408.

153. *Songer J. R., Sullivan J. F.* Safety in the biological laboratory. — J. Chem. Educ., 1974, v. 51, № 10, p. 481—488.

154. *Spicher G., Peters J.* Untersuchungen an VDV-verfahren zur dampfdesinfektion und sterilization. — Zbl. Bakteriol. Parasitenk., Infektionskrankh. und Hyg. 1977, Abt. 1—Orig., A 239, № 5—6, S. 393—422.

155. *Spicher G.* Mikrobiologische Sterilisationsindikateren. Allgemeines und Grundsätzliches. — Zbl. Bact. Hyg., I Abt. Orig. A 1973, Bd. 224, № 4, S. 527—553.

156. *Spicher G., Peters J.* Quantitative Beschreibung der Widerstandsfähigkeit mikrobiologischer Indikatoren durch Kenndaten. — Zbl. Bakt. Hyg., I Abt. Orig. A. 1975, Bd. 231, № 4, S. 541—558.

157. *Spicher G., Peters J.* Mathematishe Grundlagen der Sterilitätsprüfung. — Zbl. Bact. Hyg., I Abt. Orig. A, 1975, Bd. 230, № 1, S. 112—138.

158. *Stemmer K.* Aseptische Abfüllung mit der Strunck—Kompaktanlage. — Pharm. Ind., 1976, Bd. 38, № 6, S. 572—576.

159. *Solomons G. L.* Improvements in the design and operation of the chemostat. — J. Appl. chem. Biotechnol., 1972, v. 22, № 2, p. 217—228.

160. *Solomons G. L.* Materials and methods in fermentation equipment. — London — New York, Academic Press, 1971.

161. *Sugiyama H.* Effect of fatty acids on the heat resistance of Clostridium botulinum spores. — Bacteriol. Reviews. 1952, v. 2, p. 125—126.

162. *Ward A. S.* Filter media development and innovation. — Filtrat. Separat. 1973, v. 10, № 1, p. 61—65.

163. *Webb N. L., Richards B. M., Gooders A. P.* The total containment of a batch-type zonal centrifuge. — Biotechnol. Bioeng., 1975, v. 17, № 9, p. 1313—1322.

164. *Wang D., Scharer J., Humphrey A. E.* Kinetics of death of bacterial spores at elevated temperatures. — Appl. Microbiol., 1964, v. 12, № 5, p. 451—454.

165. *Weiss R. E., Schleicher J. B.* A multisurface tissue propagator for the mass scale growth of cell monolayers. — Biotechn. Bioeng., 1968, v. 10, № 5, p. 601—615.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие 3

1. Значение асептики в технологии микробиологических производств 5

1.1. Основные термины 5
1.2. Микробиологическая характеристика окружающей среды 7
1.3. Влияние посторонней микрофлоры на эффективность микробиологических производств 10

2. Общая характеристика процессов, обеспечивающих получение чистых культур микроорганизмов в лабораториях и на производстве 15

3. Теоретические основы процессов, обеспечивающих достижение и поддержание асептических условий 18

3.1. Термическая стерилизация 19
3.2. Химическая стерилизация 43
3.3. Стерилизация ионизирующим излучением 47
3.4. Фильтрующая стерилизация 49
3.5. Герметизация оборудования и коммуникаций . . 54
3.6. Недостатки существующих расчетных методов . . 59
3.7. Примеры практического использования некоторых расчетных методов 60

4. Термическая стерилизация оборудования и коммуникаций 65

4.1. Особенности аппаратов, трубопроводов, узлов и элементов, работающих в асептических условиях . 65
4.2. Существующие режимы и способы стерилизации . 74
4.3. Результаты экспериментального изучения стерилизуемости некоторых типовых элементов монтажных схем 77
4.4. Результаты экспериментального изучения стерилизуемости аппаратов 79
4.5. Пути повышения эффективности процессов стерилизации оборудования и коммуникаций 83

5. Термическая стерилизация жидкостей 84

5.1. Особенности термической стерилизации жидкостей . 84
5.2. Анализ существующих способов и режимов стерилизации 89

5.3. Методический подход к обоснованию оптимальных режимов стерилизации жидкостей 113
5.4. Результаты экспериментов по стерилизации некоторых жидкостей 122
5.5. Пути повышения эффективности режимов стерилизации жидкостей 126

6. Стерилизация воздуха 128

6.1. Особенности работы систем, обеспечивающих получение стерильного воздуха 128
6.2. Методы и режимы получения стерильного воздуха . 133
6.3. Результаты экспериментальной оценки задерживающей эффективности фильтров 140
6.4. Пути совершенствования систем получения стерильного воздуха 144

7. Герметизация оборудования и коммуникаций 145

7.1. Особенности герметизации оборудования, коммуникаций, узлов и элементов, работающих в асептических условиях 145
7.2. Некоторые элементы и узлы герметизации . . . 147
7.3. Результаты экспериментальной оценки эффективности герметизации промышленных технических систем, узлов и элементов, работающих в асептических условиях 154
7.4. Пути повышения эффективности герметизации технических систем 157

8. Отбор проб из аппаратов 157

8.1. Особенности отбора проб 157
8.2. Существующие методы и технические устройства . 159
8.3. Пути совершенствования методов и устройств для отбора проб 167

9. Дозированная подача стерильных жидкостей и чистых культур микроорганизмов 168

9.1. Дозирование жидкостей в асептических условиях — специфический процесс микробиологических производств 168
9.2. Особенности технических систем, предназначенных для дозирования жидкостей 175
9.3. Некоторые результаты экспериментальной оценки насоса-дозатора 177
9.4. Пути совершенствования конструкции дозаторов . 179

10. Математические основы контроля стерильности материальных потоков и чистоты культур микроорганизмов . . . 180

10.1. Контроль стерильности как вероятностно-статистическая задача 184
10.2. Пригодность партии при содержании в выборочной пробе не более одной нестерильной единицы . . 194

10.3. Повторный контроль при содержании в выборочной пробе одной или нескольких нестерильных единиц 197
10.4. Вероятность отбраковки стерильных партий вследствие чужеродного контаминирования выборочной пробы 200

11. Экспериментальные методы оценки эффективности процессов, обеспечивающих получение чистых культур микроорганизмов 208

11.1. Микробиологические индикаторы 208
11.2. Физические методы 217
11.3. Химические методы 221
11.4. Использование модельной питательной среды . . 222
11.5. Комплексная оценка возможности достижения асептических условий в аппаратах 223

12. Основы создания и функционирования технических устройств и инженерных систем защиты персонала и внешней среды от производственных вредностей 230

12.1. Основные принципы 230
12.2. Системы вентиляции 239
12.3. Герметизирующие устройства оборудования и помещений 245
12.4. Устройства для обработки мелкого оборудования, приборов и инструмента 253
12.5. Проблемы деконтаминации персонала лабораторий и микробиологических производств 257

13. Методический подход к оценке требуемой эффективности работы систем, обеспечивающих получение чистых культур микроорганизмов и защиту внешней среды 258

13.1. Внутренняя задача 258
13.2. Внешняя задача 282

Заключение 294

Список литературы 299

ВИЛЛЕН ЕФИМОВИЧ МАТВЕЕВ

ОСНОВЫ АСЕПТИКИ В ТЕХНОЛОГИИ ЧИСТЫХ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Редактор *Е. А. Гоголина*
Художник *Н. В. Гусев*
Художественный редактор *В. А. Чуракова*
Технический редактор *Г. Г. Хацкевич*
Корректоры *Н. П. Багма, А. И. Гурычева*

ИБ № 1074

Сдано в набор 27.10.80. Подписано в печать 15.05.81. Т-08027. Формат 84×108$^{1}/_{16}$. Бумага типографская № 2. Гарнитура шрифта литературная. Печать высокая. Усл. печ. л. 16,38. Усл. кр. отт. 16,64. Уч.-изд. л. 17,46. Тираж 2500 экз. Заказ № 1950. Цена 1 руб.

Издательство «Легкая и пищевая промышленность», 113035, Москва, М-35, 1-й Кадашевский пер., 12.

Московская типография № 6 Союзполиграфпрома
при Государственном комитете СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли,
109088, Москва, Ж-88, Южнопортовая ул., 24.

Дзяржаўная
бібліятэка
БССР

ПОПРАВКА

Стр.	Строка	Напечатано	Следует читать
81	7, 8, 9-я сверху	подачи пара в нижнюю часть аппарата представлены на рис. 10. существующих режимах стерилизации не являются «слабыми». Некоторые полученные экспериментальные данные для варианта	существующих режимах стерилизации не являются «слабыми». Некоторые полученные экспериментальные данные для варианта подачи пара в нижнюю часть аппарата представлены на рис. 10.

Зак. 4839/1950